

明細書

融合蛋白質組成物

技術分野

本発明は、結合性蛋白質と N-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体 Fc 領域との融合蛋白質分子からなる融合蛋白質組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である融合蛋白質組成物、該組成物を生産する形質転換体、該組成物の製造法および該組成物からなる医薬品に関する。

背景技術

抗体は、その抗原と特異的に結合し、Fc 領域に特異的な受容体でエフェクター細胞に発現する細胞膜発現型 Fc 受容体を介して、ナチュラルキラー細胞、活性化マクロファージ等のエフェクター細胞の細胞障害活性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; 以下、ADCC 活性と表記する)を誘導する。

抗体においては、近年、Rituxan による非ホジキン白血病患者の治療、Herceptin による乳癌患者の治療において、該抗体医薬が患者のエフェクター細胞に強い抗体依存性細胞性細胞傷害活性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; 以下、ADCC 活性と表記する) を惹起した場合には、より高い治療効果が得られている (Blood, 99, 754, 2002; J. Clin. Oncol., 21, 3940, 2003; Clin. Cancer Res., 10, 5650, 2004)。

抗体の可変領域は、抗原との特異的結合に関係するドメインである。一方、抗体の定常領域は、抗体分子の安定化や抗体のエフェクター機能を担うドメインである。特に、IgG クラスの抗体 Fc 領域(抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域)はエフェクター細胞上の Fc 受容体の一員である Fc γ IIIa を介して、ADCC 活性を示す。従って、特定の分子との結合活性を有する蛋白質分子 (以下、結合性蛋白質という) と融合蛋白質は、抗体分子と同様に、特定の分子と結合することができ、かつ、Fc 領域が介する ADCC 活性を持つ。

これまでに、種々の結合性蛋白質と Fc 領域との融合蛋白質が作製されており、該蛋白質の持つ ADCC 活性について検討されている [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7995(1993)]。

例えば、抗体に類似した形状の分子として、抗体の重鎖可変領域（以下、VH と表記する）と軽鎖可変領域（以下、VL と表記する）を含む蛋白質分子である一本鎖抗体（以下、scFv と表記する）の Fc 融合蛋白質が ADCC 活性を持つことが知られている。例えば、癌細胞の表面抗原として知られている TAG-72 (Tumor-Associated Glycoprotein-72) に対するマウスモノクローナル抗体（以下、抗 TAG-72 抗体と記す）から作製した scFv との Fc 融合蛋白質（以下、scFv-Fc と表記する）[J. Immunol. Methods, 261, 199 (2002)] は TAG-72 陽性細胞に対して ADCC 活性を持つ。また、メラノーマ患者より作製した抗体のファージライブラリーを、メラノーマ細胞に対してパニングを行うことによって得られた scFv-Fc はメラノーマ細胞に特異的な ADCC 活性を示した [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1627 (1999)]。

融合させる scFv は、一つには限られない。scFv-Fc の N 末端にもう一つの scFv を連結させた分子は scFv₂-Fc と呼ばれ、scFv の由来となる抗体の特異性により、二種類の結合特異性をあわせ持つ。このような分子では、抗原への結合活性が低下することが知られているが [Mol. Immunol., 37, 1123 (2000)]、その ADCC 活性は確認されていない。近年、医薬品の併用療法など、複数種の標的分子への同時作用による薬効の向上が有望視されており、抗体医薬の分野でも、二種の標的分子に対して特異的に結合する、二重特異性抗体が知られている。二重特異性抗体は一剤で二種類の分子を標的とするため、薬効の相加効果、相乗効果が期待されている。

また、scFv 以外の結合性蛋白質としては、サイトカイン、ケモカイン、アポトーシス誘導シグナル分子、共刺激分子、増殖因子あるいは分化誘導因子などが知られている。該結合蛋白質の受容体と Fc との融合蛋白質は多数報告されており、例えば可溶性腫瘍壊死因子- α 受容体 II（以下、sTNFR_{II} と表記する）と Fc との融合蛋白質である Etanercept [USP5605690]、抗原提示細胞上に発現している lymphocyte function-associated antigen 3 (以下、LFA-3 と表記する) と Fc との融合蛋白質である Alefacept (USP5914111)、Cytotoxic T Lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) と融合蛋白質 [J. Exp. Med., 181, 1869 (1995)]、インターロイキン-15 と抗体 Fc との融合蛋白質 [J. Immunol., 160, 5742 (1998)]、ファクター VII と Fc との融合蛋白質 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 12180 (2001)]、インターロイキン 10 と Fc との融合蛋白質 [J. Immunol., 154, 5590 (1995)]、インターロイキン 2 と Fc との融合蛋白質 [J. Immunol., 146, 915 (1991)]、CD40 と Fc との融合蛋白質 [Surgery.

132, 149(2002)] および OX40 と Fc との融合蛋白質 [J. Leu. Biol., 72, 522 (2002)] などが挙げられる。これらの中で、Etanercept、Alefcept はすでに医薬品として利用されている。しかしながら、一般に融合蛋白質の標的分子に対する結合活性は抗体の抗原に対する結合活性と比較して低く [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7995 (1993)、J. Pharmacol. Exp. Ther., 301, 418 (2002)]、天然型のままで医薬品として利用できる融合蛋白質は限られている。

ADCC 活性は、ヒト IgG1 サブクラス抗体の Fc 領域と Fc γ レセプター（以下、Fc γ R と表記する）との相互作用を介して誘導される。抗体と Fc γ R との結合においては、抗体のヒンジ領域及び C 領域の第 2 番目のドメイン（以下、C γ 2 ドメインと表記する）に結合している糖鎖の重要性が示唆されている [Chemical Immunology, 65, 88 (1997)]。

抗体 IgG 分子の Fc 領域に結合している N-グリコシド結合複合型糖鎖の非還元末端へのガラクトースの付加、および還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加に関しては多様性があることが知られており [Biochemistry, 36, 130 (1997)]、特に糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加により、抗体の ADCC 活性が大きく低下することが報告されている [W000/61739、J. Biol. Chem., 278, 3466 (2003)]。

融合蛋白質は、遺伝子組換え技術を利用し、動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞などを宿主細胞として製造されるが、発現させた融合蛋白質の糖鎖構造は宿主細胞によって異なることが考えられる。

例えば、抗体生産細胞内の α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8)、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD)、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) の活性を低下または欠失することにより、Fc 領域を有する抗体分子からなる組成物中で、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を増加させることができることが知られている [W002/31140]。

発明の開示

本発明の目的は、結合性蛋白質と N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体 Fc 領域との融合蛋白質からなる融合蛋白質組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である融合蛋白

質組成物、該融合蛋白質組成物を生産する形質転換体、該融合蛋白質組成物の製造方法および該融合蛋白質組成物を含有する医薬等を提供することにある。本発明の融合蛋白質は高い細胞傷害活性を有するため、治療の標的となる細胞を患者の体内から減少させる治療に有用である。高い細胞傷害活性を有する融合蛋白質を治療に用いることにより、化学療法、放射性同位元素標識体などと併用が不要となることから患者への副作用を軽減させることが期待される。また、患者への治療薬の投与量を減少させることで患者への負担の軽減などが期待される。

本発明は、以下の（１）～（３９）に関する。

（１） 結合性蛋白質と N-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体 Fc 領域との融合蛋白質分子からなる医薬融合蛋白質組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である融合蛋白質組成物。

（２） N-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合していない糖鎖である、（１）に記載の融合蛋白質組成物。

（３） 抗体 Fc 領域がヒト抗体の IgG クラスである、（１）または（２）に記載の融合蛋白質組成物。

（４） 抗体 Fc 領域がヒト抗体の IgG1 クラスである、（３）に記載の融合蛋白質組成物。

（５） 抗体融合蛋白質組成物が、ヒト抗体の IgG1 クラス重鎖定常領域ドメイン 2（CH₂）を含む（４）に記載の融合蛋白質組成物。

（６） 融合蛋白質組成物が、ヒト抗体ヒンジ領域、抗体の IgG1 クラス重鎖定常領域ドメイン 2（CH₂）および抗体重鎖定常領域ドメイン 3（CH₃）を含む（５）に記載の融合蛋白質組成物。

（７） 結合性蛋白質が、抗体の結合性断片、可溶性受容体およびリガンド蛋白質からなる群から選ばれる蛋白質を少なくとも 1 つ含む（１）～（６）のいずれか 1 項に記載の融合蛋白質組成物。

（８） 抗体の結合性断片が、抗体重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含むポリペプチド鎖を少なくとも 1 つ含む（７）に記載の融合蛋白質組成物。

（９） 抗体重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含むポリペプチド鎖が、一本

鎖抗体である（８）に記載の融合蛋白質組成物。

（１０） 抗体の結合性断片が、一本鎖抗体である（７）に記載の融合蛋白質組成物。

（１１） 抗体の結合性断片が、二種類の抗体重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含むポリペプチド鎖を含む（７）に記載の融合蛋白質組成物。

（１２） 抗体重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含むポリペプチド鎖が、一本鎖抗体である（１１）に記載の融合蛋白質組成物。

（１３） 抗体の結合性断片が、二重特異性一本鎖抗体である（７）に記載の融合蛋白質組成物。

（１４） 可溶性受容体が、可溶性 TNF (Tumor necrosis factor) 受容体 II である（７）に記載の融合蛋白質組成物。

（１５） 可溶性受容体が、配列番号 64 で示されるアミノ酸配列を含む（１５）に記載の融合蛋白質組成物。

（１６） 融合蛋白質が、FERM BP-8499 により生産される（１４）または（１５）に記載の融合蛋白質組成物。

（１７） リガンド蛋白質が、LFA-3 (leukocyte Function Antigen-3) である（７）に記載の融合蛋白質組成物。

（１８） リガンド蛋白質が、配列番号 65 で示されるアミノ酸配列を含む（１６）に記載の融合蛋白質組成物。

（１９） 融合蛋白質が、FERM BP-8500 により生産される（１７）または（１８）に記載の融合蛋白質組成物。

（２０） 融合蛋白質組成物が、２量体である（１）～（１９）のいずれか１項に記載の融合蛋白質組成物。

（２１） （１）～（２０）のいずれか１項に記載の融合蛋白質をコードする DNA を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

（２２） 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素を失活するようにゲノムが改変された細胞である、（２１）に記載の形質転換体。

(23) 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞である、(22) に記載の形質転換体。

(24) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD) および GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) からなる群から選ばれる酵素である、(22) または (23) に記載の形質転換体。

(25) GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) または (b) から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(24) に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(26) GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質。

(27) GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a) または (b) から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(24) に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(28) GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a) ~ (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の形質転換体。

- (a) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質；
- (c) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

(29) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α 1,6-フコシルトランスフェラーゼである

(22) または (23) に記載の形質転換体。

(30) α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)~(d)からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(29) に記載の形質転換体。

- (a) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA；
- (b) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA；
- (c) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA；
- (d) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(31) α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)~(f)からなる群から選ばれる蛋白質である、(29) に記載の形質転換体。

- (a) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (c) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (d) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (e) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、

かつ $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(32) 宿主細胞が、下記の(a)~(h)からなる群から選ばれる細胞である(21)~(31)のいずれか1項に記載の形質転換体。

(a) チャイニーズハムスター卵巢組織由来 CHO 細胞；

(b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞；

(c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(f) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(g) 胚性幹細胞；

(h) 受精卵細胞。

(33) 形質転換体が FERM BP-8499 である(21)~(32)のいずれか1項に記載の形質転換体。

(34) 形質転換体が FERM BP-8500 である(21)~(32)のいずれか1項に記載の形質転換体。

(35) (21)~(34)のいずれか1項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該抗体組成物を採取し、精製する、(1)~(20)のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物の製造方法。

(36) (35)に記載の製造方法により得られる、(1)~(20)のいずれか1項に記載の抗体融合蛋白質組成物。

(37) (1)~(20)および(36)のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物を有効成分として含有する医薬。

(38) (1)~(20)および(36)のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物を有効成分として含有する医薬が、腫瘍、炎症性疾患または自己免疫疾患の予防薬または治療薬。

(39) 腫瘍が、血液腫瘍または癌である(38)に記載の疾患の予防薬または治療薬。

以下、本発明を詳細に説明する。本願は2003年10月8日に出願された日本国特許出願

2003-350158 号の優先権を主張するものであり、当該特許出願の明細書および図面に記載される内容を包含する。

本発明の結合性蛋白質と N-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体 Fc 領域との融合蛋白質組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である融合蛋白質組成物としては、結合性蛋白質と N-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体 Fc 領域との融合蛋白質組成物であって、該 N-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合していない糖鎖である融合蛋白質組成物があげられる。

本発明において抗体 Fc 領域としては、抗体エフェクター活性を有する抗体サブクラスの抗体由来の Fc 領域であればよく、医薬品としての利用の点から、好ましくはヒト IgG クラス由来の抗体 Fc 領域が、特に好ましくはヒト IgG1 クラス由来の抗体 Fc 領域が用いられる。IgG クラス抗体由来の抗体 Fc 領域とは、重鎖定常領域ドメイン 2（以下、CH₂と記す）ドメイン 3（以下、CH₃と記す）を含むポリペプチド鎖のことをいう。

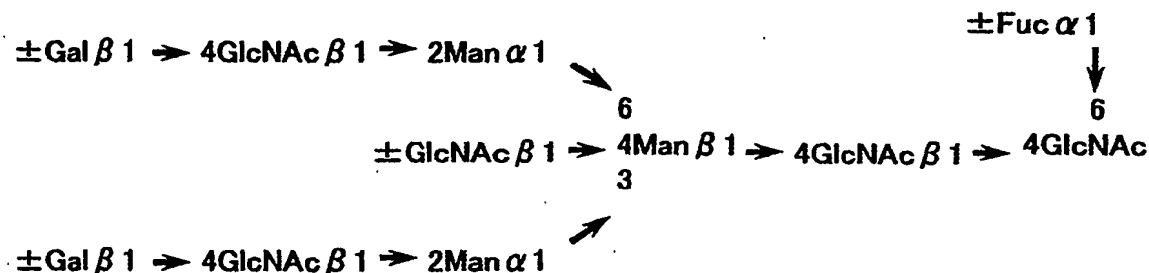
抗体エフェクター活性としては、抗体依存性細胞性細胞傷害活性（以下、ADCC 活性と記す）あるいは補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC 活性と表記する）などがあげられる。ADCC 活性は、抗体 Fc 領域と抗体 Fc 受容体である Fc γ 受容体とが結合して発現される細胞傷害活性である。CDC 活性は、抗体 Fc 領域と補体成分とが結合して発現される細胞傷害活性である。

抗体 Fc 領域には、N-グリコシド結合糖鎖が結合する。従って、Fc 融合蛋白質の 1 ポリペプチド鎖につき 1 本の糖鎖が結合している。

N-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAc と表記する）の側鎖を並行して 1 ないしは複数本有し、更に Gal-GlcNAc の非還元末端側にシアル酸、バイセクティングの N-アセチルグルコサミンなどを有するコンプレックス型（複合型）糖鎖をあげることができる。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖としては、下記化学式 1 で示される。

化学式 1



本発明において、フコースが結合していない糖鎖としては、上記で示された化学式中、還元末端側の N-アセチルグルコサミンにはフコースが結合されていないものであればよく、非還元末端の糖鎖の構造はいかなるものでもよい。

したがって、本発明の抗体組成物としては、上記の糖鎖構造を有していれば、単一の糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。

本発明において、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していないとは、実質的にフコースが結合していないことをいう。実質的にフコースが結合していない融合蛋白質組成物とは、具体的には、後述の 4 に記載の糖鎖分析において、フコースが実質的に検出できない程度の融合蛋白質組成物である場合をいう。実質的に検出できない程度とは、測定の検出限界以下であることを意味する。糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない本発明の融合蛋白質組成物は、高い ADCC 活性を有する。

N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する融合蛋白質分子からなる組成物中に含まれる、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を有する融合蛋白質分子の割合は、融合蛋白質分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法[生物化学実験法 23—糖蛋白質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（1989）]を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識又は同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラ

フィー法にて分離することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖を HPAED-PAD 法 [J. Liq. Chromatogr., 6, 1577 (1983)] によって分析することで決定することができる。

本発明で用いられる結合性蛋白質としては、特定の生体内物質と特異的に結合できる蛋白質があげられる。特定の生体内物質としては、蛋白質性の高分子、糖鎖、細胞膜の構成成分などの疾患の病変細胞の表面に疾患特異的に発現している生体内物質があげられる。具体的には、種々の腫瘍細胞に発現する受容体、ガングリオシド、膜アンカー型抗体、膜アンカー型酵素などがあげられる。

結合性蛋白質が特異的に結合するとは、結合性蛋白質が特定の物質と結合できることをいい、一般的には 1 種類の結合性蛋白質は数種類の物質に、好ましくは 2～3 種類の物質に、より好ましくは 1 種類の物質に結合することをいう。

結合性蛋白質としては、特定の生体内物質に結合する領域を含んでいればよく、結合性蛋白質の一部の領域または全部でもよい。また、同一の結合性蛋白質の 2 ヶ所以上の領域を抗体 Fc 領域と結合させることもできる。

さらに、本発明においては、同一または異なる結合性蛋白質を抗体 Fc 領域と結合させることもでき、結合させる結合性蛋白質の数は、1 以上であればよい。

本発明の結合性蛋白質としては、具体的には、抗体の結合性断片、受容体のリガンド、可溶性の受容体、核酸結合蛋白質、細胞膜結合蛋白質、脂質結合蛋白質、脂肪酸結合蛋白質、糖あるいは糖鎖結合蛋白質、酵素の基質のドミナントネガティブ体および酵素のドミナントネガティブ体などがあげられるが、抗体、抗体の結合性断片、受容体のリガンドおよび可溶性の受容体などが好適に用いられる。

本発明に用いられる抗体としては、疾患の病変細胞あるいは病変細胞の表面に発現している生体内物質に結合するモノクローナル抗体があげられる。モノクローナル抗体は、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, (1998) に記載の公知の方法、生体から取得した抗体産生細胞を不死化して株化する方法および人工の抗体ファージライブラリーから、パンニングにより抗体および抗体遺伝子を選択するファージディスプレイ法などにより取得することができる。

本発明において、結合性蛋白質として抗体の結合性断片を用いることができる。該抗体の

結合性断片は、上記のモノクローナル抗体から、消化酵素を用いて消化する方法、あるいは該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抗体をコードする遺伝子を取得し、蛋白質工学的手法を用いる方法により、作製することができる。

抗体の結合性断片としては、抗体の可変領域の一部あるいは全部を含み、該抗体に対応する抗原への結合活性を保持した結合性断片があげられる。抗体の可変領域の一部を含む抗体断片は、必要に応じて、好みの形状で発現させるように設計でき、抗体Fc領域と連結するために適当なアミノ酸配列を挿入することもできる。非ヒト動物由来の抗体であれば、フレームワークのアミノ酸配列をヒト抗体由来の配列と置換して、免疫原性を低くすることも可能である。抗体の結合性断片としては、以下に示す、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv（一本鎖抗体）、scFv多量体、diabody、dsFv および CDR を含むペプチドなどがあげられる。

Fab は、IgG を蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される）、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

Fab は、抗体分子を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体分子のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

F(ab')₂ は、IgG を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

F(ab')₂ は、抗体分子を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、製造することができる。

Fab' は、上記F(ab')₂ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

Fab' は、F(ab')₂ を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

scFv は、1 本の VH と 1 本の VL とを適当なペプチドリンカー（以下、P と記す）を用いて、VH-P-VL ないしは VL-P-VH の順で連結されたポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

scFv は、抗体分子の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

scFv 多量体は、複数の scFv を適当なペプチドリンカーを用いて、 $\text{scFv}-(\text{P-scFv})_n$ のように連結されたポリペプチド鎖で、各 scFv に対応するそれぞれの抗原に対する結合活性を有する。例えば、二種類の scFv を同一ポリペプチド鎖中に含む scFv_2 （二重特異性一本鎖抗体）などがあげられる。scFv 多量体に含まれる個々の scFv の組み合わせは、どのような組み合わせであってもよく、同一の scFv が複数個の組み合わせまたは複数種類の scFv の組み合わせでもよい。

scFv 多量体は、上記 scFv と同様にして蛋白質工学的手法を用いて製造することができる。

diabody は、scFv が二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。diabody が持つ二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

diabody は、抗体分子の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を P のアミノ酸配列の長さが 12 残基以下となるように構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

dsFv は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 [Protein Engineering, 7, 697 (1994)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

dsFv は、抗体分子の VH および VL をコードする cDNA を取得し、dsFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することがで

きる。

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

CDRを含むペプチドは、抗体分子のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（*t*-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明の融合蛋白質組成物に用いられる抗体の結合性断片としては、scFvが好適に用いられる。scFvは、一種類の抗体由来のscFvであってもよいし、二種類の抗体由来の二種類のscFvを一本のポリペプチド鎖として発現させ、一本のポリペプチド鎖中に二種類の結合特異性を有するscFv₂であってもよい。scFvとしては、任意の抗体から作製したscFvであればいかなるものでもよいが、具体的には、癌細胞の表面抗原として知られているTAG-72に対するマウスモノクローナル抗体のそれぞれ配列番号9、10、11で示されるアミノ酸配列からなる抗体VHのCDR1、CDR2、CDR3およびそれぞれ配列番号12、13、14で示されるアミノ酸配列からなる抗体VLのCDR1、CDR2、CDR3を含むscFv、配列番号15で示されるアミノ酸配列からなる抗体VHおよび配列番号16で示されるアミノ酸配列からなる抗体VLを含むscFvまたは配列番号17で示されるアミノ酸配列を含むscFvなどがあげられる。また、癌細胞の表面抗原として知られているMUC1に対するマウスモノクローナル抗体のそれぞれ配列番号66、67、68で示されるアミノ酸配列からなる抗体VHのCDR1、CDR2、CDR3およびそれぞれ配列番号69、70、71で示されるアミノ酸配列からなる抗体VLのCDR1、CDR2、CDR3を含むscFv、配列番号72で示されるアミノ酸配列からなる抗体VHおよび配列番号73で示されるアミノ酸配列からなる抗体VLを含むscFvまたは配列番号74で示されるアミノ酸配列を含むscFvなどもあげられる。

scFv₂としては、任意のscFvを組み合わせたものであればいかなるものでもよく、scFvは同一であっても、異なってもよい。具体的には、それぞれ配列番号9、10、11で示されるアミノ酸配列からなる抗体VHのCDR1、CDR2、CDR3およびそれぞれ配列番号12、13、14

で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VL の CDR 1、CDR2、CDR3 を含む scFv からなる scFv₂、それぞれ配列番号 66、67、68 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VH の CDR 1、CDR2、CDR3 およびそれぞれ配列番号 69、70、71 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VL の CDR 1、CDR2、CDR3 を含む scFv からなる scFv₂、それぞれ配列番号 9、10、11 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VH の CDR 1、CDR2、CDR3 およびそれぞれ配列番号 12、13、14 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VL の CDR 1、CDR2、CDR3 を含む scFv、およびそれぞれ配列番号 66、67、68 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VH の CDR 1、CDR2、CDR3 およびそれぞれ配列番号 69、70、71 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VL の CDR 1、CDR2、CDR3 を含む scFv からなる scFv₂、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列をからなる抗体 VH および配列番号 16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VL を含む scFv からなる scFv₂、配列番号 72 で示されるアミノ酸配列をからなる抗体 VH および配列番号 73 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VL を含む scFv からなる scFv₂、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列をからなる抗体 VH および配列番号 16 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VL を含む scFv、および配列番号 72 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VH および配列番号 73 で示されるアミノ酸配列からなる抗体 VL を含む scFv からなる scFv₂、配列番号 75 で示されるアミノ酸配列からなる scFv₂ または配列番号 76 で示されるアミノ酸配列からなる scFv₂ などがあげられる。

本発明において、可溶性受容体としては、細胞表面に発現しているリガンドに結合できる受容体であればいかなるものでもよく、このような受容体のリガンド結合領域を、リガンドに対する結合活性を保持した形で蛋白質工学的手法により作製することができる受容体なども包含される。具体的には、可溶型 TNF (Tumor Necrosis Factor) II 受容体または配列番号 64 で示されるアミノ酸配列を含む可溶性受容体などがあげられる。

本発明において、受容体のリガンド蛋白質としては、ヒト体内の細胞表面に発現している受容体のリガンド蛋白質があげられる。該リガンド蛋白質は、対応する特定の受容体に結合可能であれば、該受容体の活性に影響を及ぼしてもよい。例えば、リガンド蛋白質の結合により該受容体が介在する情報伝達経路が活性化されてもよいし、該情報伝達系を不活化してもよく、また、該情報伝達系に影響を与えなくてもよい。リガンドの結合により受容体が介在する情報伝達系が活性化されるリガンドとは、野生型リガンドまたはアゴニスト活性を有するペプチドなどがあげられる。リガンドの結合により受容体が介在する情報伝達系を不活

化させるリガンド蛋白質とは、野生型リガンドのドミナントネガティブ体またはアンタゴニスト活性を有するペプチドなどがあげられる。

本発明の受容体のリガンドとしては、具体的には LFA-3 (Leukocyte Function Antigen-3) または配列番号 65 で示されるアミノ酸配列を含むリガンド蛋白質などがあげられる。

本発明の抗体 Fc 領域としては、Fc γ IIIa 受容体との結合に直接関与している抗体重鎖定常領域ドメイン 2 (以下、CH₂と記す) が少なくとも 1 つ含まれていればよい。

本発明の融合蛋白質組成物としては、例えば、以下の (a) ~ (f) があげられる。本発明の融合蛋白質組成物は、単量体、ホモ二量体およびヘテロ二量体を形成していてもよい。以下において、CH₂ および抗体重鎖定常領域ドメイン 3 (以下、CH₃と記す) は、ヒト IgG1 クラスであることが好ましい。

- (a) 結合性蛋白質- CH₂ ;
- (b) 結合性蛋白質- CH₂- CH₃ ;
- (c) CH₂-結合性蛋白質 ;
- (d) CH₂- CH₃-結合性蛋白質 ;
- (e) 結合性蛋白質- CH₂-結合性蛋白質 ;
- (f) 結合性蛋白質- CH₂- CH₃-結合性蛋白質 ;

上記 (a) ~ (f) の連結されたポリペプチド鎖において、結合性蛋白質は、1 つ以上の結合性蛋白質が含まれていればよい。また、1 つのポリペプチド鎖中に 2 つの結合性蛋白質のポリペプチド鎖が含まれている融合蛋白質の場合には、2 つの結合性蛋白質が結合できる生体内物質は同一でも、異なってもよい。

本発明において、融合蛋白質は上記 (a) ~ (f) の各蛋白質を構成要素として結合したものであってもよい。ここで各構成要素は同一であっても、異なっても、よく、同一の順番の繰り返しでもよい。上記 (a) ~ (f) の各構成要素の間は、直接各構成要素を連結してもよいし、抗体定常領域に由来するヒンジ配列などのリンカーを介して結合してもよい。さらに、結合性蛋白質の結合特異性および抗体 Fc 領域のエフェクター活性に大幅な変化を生じない程度に、各構成要素のアミノ酸残基に 1 つ以上のアミノ酸を付加、欠失および／または置換させてもよい。

本発明の形質転換体としては、融合蛋白質分子をコードする DNA を宿主細胞に導入して得

られる形質転換体であって、本発明の融合蛋白質組成物を生産する形質転換体であればいかなる形質転換体でも包含される。具体的な例としては、融合蛋白質分子をコードする DNA を以下の(a)または(b)などの宿主細胞に導入して得られる形質転換体があげられる。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が失活するようにゲノムが改変された細胞；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活するようにゲノムが改変された細胞。

上述において、酵素が失活するようにゲノムが改変されたとは、該酵素の発現を欠失させるように該酵素をコードする遺伝子の発現調節領域に変異を導入したり、または該酵素を失活させるように該酵素をコードする遺伝子のアミノ酸配列に変異を導入することをいう。変異を導入するとは、ゲノム上の塩基配列を欠失、置換、挿入および／または付加させるといった塩基配列の改変を行うことをいう。このように改変されたゲノム遺伝子の発現または活性が完全に抑制されることをゲノム遺伝子がノックアウトされるという。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD)、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) などがあげられる。

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼとしては、

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA；などがあげられる。

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼとしては、

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質；

などがあげられる。

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼとしては、

(a) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

などがあげられる。

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼとしては、

(a) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質 ;
などがあげられる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼがあげられる。

本発明において、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、下記(a)~(d)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA

(c) 配列番号 5 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA

(d) 配列番号 6 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA
または、

(e) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(f) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(g) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(h) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(i) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(j) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質
等があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 1 または 3 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 1 または 3 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素活性を有する蛋白質をコードする DNA などがあげられる。

α 1,6-フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 5 または 6 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 5 または 6 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA などがあげられる。

本発明において、ストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA とは、例えば配列番号 1、3、5 または 6 で表される塩基配列からなる DNA などの DNA またはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0M の塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2 倍濃度の SSC 溶液（1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよ

りなる)を用い、65°C条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能な DNA として具体的には、配列番号 1、3、5 または 6 で表される塩基配列と少なくとも 60%以上の相同性を有する DNA、好ましくは 70%以上、より好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上、特に好ましくは 95%以上、最も好ましくは 98%以上の相同性を有する DNA をあげることができる。

本発明において、配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素活性を有する蛋白質、または配列番号 7 または 8 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号 1、3、5 または 6 で表される塩基配列を有する DNA に部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および/または付加されるアミノ酸の数は 1 個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1~数十個、好ましくは 1~20 個、より好ましくは 1~10 個、さらに好ましくは 1~5 個である。

また、本発明において配列番号 2、4、7 または 8 であらわされるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性、または α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質としては、具体的には、それぞれ配列番号 2、4、7 または 8

で表されるアミノ酸配列と BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] や FASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)] 等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも 80%以上、好ましくは 85%以上、より好ましくは 90%以上、さらに好ましくは 95%以上、特に好ましくは 97%以上、最も好ましくは 99%以上の相同性を有する蛋白質などをあげることができる。

また、本発明に用いられる宿主細胞、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活した宿主細胞を取得する方法としては、目的とする酵素を失活させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素を失活させる手法としては、

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；
- (e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法などがあげられる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin)、エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒヨロチャワシタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) 等を挙げることができる。

レクチンに耐性な細胞とは、レクチンを有効濃度与えたときにも、生育が阻害されない細胞を言う。有効濃度とは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞（以下、親株とも称す）が正常に生育できない濃度以上であり、好ましくは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞が成育できない濃度と同濃度、より好ましくは 2~5 倍、さらに好ましくは 10 倍、最も好ましくは 20 倍以上である。

生育が阻害されないレクチンの有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよく、通常のレクチンの有効濃度は $10\mu\text{g/mL}$ ~ 10mg/mL 、好ましくは 0.5mg/mL ~ 2.0mg/mL である。

本発明の融合蛋白質組成物を生産させる宿主細胞としては、本発明の融合蛋白質分子を発現できる上記宿主細胞であればいかなる細胞も包含する。例えば、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられる。これらの細胞としては、後述 1 に記載のものがあげられ、特に、動物細胞の中でも、チャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞、ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞、マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞、マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞、ヒト白血病細胞株 ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などが好ましい。

本発明の形質転換株としては、具体的には、本発明の TAG (Tumor-Associated Glycoprotein) -72 に結合性を有する融合蛋白質の遺伝子を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞株 CHO/DG44 細胞の形質転換株 KC1200、可溶性 TNF (Tumor necrosis factor) 受容体 II の融合蛋白質の遺伝子を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞株 CHO/DG44 細胞の形質転換株 KC1194 および LFA-3 (leukocyte Function Antigen-3) の融合蛋白質の遺伝子を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞株 CHO/DG44 細胞の形質転換株 KC1198 があげられる。なお、上記の CHO 細胞株 CHO/DG44 細胞の形質転換株は、平成 15 年 9 月 30 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に、KC1194 は FERM BP-8499 として、KC1198 は FERM BP-8500 として、また、平成 15 年 10 月 3 日付けで KC1200 は FERM BP-8503 として寄託されている。

以下に、本発明の融合蛋白質組成物を生産する細胞の作製方法、本発明の融合蛋白質組成物の製造方法および本発明の融合蛋白質組成物の分析方法ならびに利用方法について説明する。

1. 本発明の融合蛋白質組成物を生産する宿主細胞の作製

本発明の融合蛋白質を生産する細胞（以下、本発明の細胞と称す）は、以下に述べる手法により、本発明の融合蛋白質組成物を生産するために用いる宿主細胞を作製し、該宿主細胞に後述 2 に記載の方法により、融合蛋白質をコードする遺伝子を導入することにより、作製することができる。

(1) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ（以下、GMD と表記する）、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ（以下、Fx と表記する）などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

ここでいう遺伝子とは、DNA または RNA を含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RNA-DNA オリゴヌクレオチド法（以下、RDO 法と表記する）、RNA インターフェアレンス法（以下、RNAi 法と表記する）、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法等があげられる。以下これらを具体的に説明する。

(a) アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の細胞を作製するための宿主細胞の作製

本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素遺伝子を標的とし、細胞工学, 12, 239 (1993)、BIO/TECHNOLOGY, 17, 1097 (1999)、Hum. Mol. Genet., 5, 1083 (1995)、細胞工学, 13, 255 (1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 1886 (1999)等に記載されたアンチセンス法またはリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA あるいはゲノム DNA を調製する。

調製した cDNA あるいはゲノム DNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA 部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムを設計する。

該アンチセンス遺伝子、またはリボザイムを細胞内で発現させるために、調製した DNA の断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造または産生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の組成物を作製のために用いる宿主細胞を得ることもできる。

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いられる宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能であるか、ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子、またはリボザイムを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述 2 に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入方法としては、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型

糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、以下の方法があげられる。

形質転換体を選択する方法

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活した細胞を選択する方法としては、文献[新生化学実験講座3—糖質I, 糖蛋白質(東京化学同人)日本生化学会編(1988)]、文献[細胞工学, 別冊, 実験プロトコルシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコル, 糖蛋白質・糖脂質・プロテオグリカン(秀潤社製)谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修(1996)]、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997)等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などを用いて、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法があげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子の mRNA 量を測定するノーザン解析や RT-PCR 法等があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述1の(5)に記載の方法があげられる。産生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA を調製する方法としては、例えば、下記に記載の方法があげられる。

cDNA の調製方法

各種宿主細胞の組織又は細胞から全 RNA 又は mRNA を調製する。

調製した全 RNA 又は mRNA から cDNA ライブラリーを作製する。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製した cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNA ライブラリーをスクリーニングし、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA を取得することができる。

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞の mRNA は市販のもの(例えば Clontech 社)を用いてもよいし、以下のようにしてヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から調製してもよい。

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)] などがあげられる。

また、全 RNA から poly(A)⁺ RNA として mRNA を調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)] 等があげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社) などの市販のキットを用いることにより mRNA を調製することができる。

調製したヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞 mRNA から cDNA ライブラリーを作製する。cDNA ライブラリー作製法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997)、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えば SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies 社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE 社) を用

いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE 社、Strategies, 5, 58(1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、 λ ZAP II (STRATAGENE 社)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (Clontech 社)、 λ ExCell (Pharmacia 社)、pT7T318U (Pharmacia 社)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] および pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

cDNA ライブラリーを作製するための宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、Escherichiacoli XL1-Blue MRF' [STRATAGENE 社、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichiacoli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coliY1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coliY1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coliNM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichiacoli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] および Escherichiacoli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーは、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長 cDNA の割合を下げ、完全長 cDNA を効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [Gene, 138, 171 (1994); Gene, 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNA クローニング(羊土社)(1996); 遺伝子ライブラリーの作製法(羊土社) (1994)] を用いて調製して以下の解析に用いてもよい。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の 5' 末端および 3' 末端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製した cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] を用いて DNA の増幅を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得することが

できる。

取得した遺伝子断片が細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA であることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片をプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションやブラークハイブリダイゼーション [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997)] 等を用いて、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の DNA を取得することができる。

また、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを使用し、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法を用いて増幅することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を取得することもできる。

取得した細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA の塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

決定した cDNA の塩基配列をもとに、BLAST 等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBL および DDBJ などの塩基配列データベースを検索することにより、取得した DNA がデータベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 1 または 3 に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られる N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 5 または 6 に記載の塩基配列があげられる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用した DNA 合成機 model 392 (Perkin Elmer 社製) 等の DNA 合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を取得することもできる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

ゲノム DNA の調製方法

ゲノム DNA を調製する方法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997)等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノム DNA ライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems 社) や Universal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH 社) などを用いることにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を取得

することもできる。

取得した細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA の塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

決定したゲノム DNA の塩基配列をもとに、BLAST 等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBL および DDBJ などの塩基配列データベースを検索することにより、取得した DNA がデータベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用した DNA 合成機 model 392 (Perkin Elmer 社製) 等の DNA 合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を取得することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列としては、例えば配列番号 110、111、112 および 113 に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られる N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列としては、例えば配列番号 55 に記載の塩基配列があげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリ

ゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、公知の方法または DNA 合成機により調製することができる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA およびゲノム DNA の塩基配列のうち、連続した 5~150 塩基、好ましくは 5~60 塩基、より好ましくは 10~40 塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成して調製することができる。

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴ RNA および該オリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）等があげられる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N3'-P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンが C-5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる [細胞工学, 16, 1463 (1997)]。

(b) 相同組換え法による本発明の融合蛋白質組成物を作製するための宿主細胞の作製

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチ

ルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用いて染色体を改変することによって作製することができる。

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) (以下、「ES細胞を用いた変異マウスの作製」と略す) 等に記載の方法を用い、例えば以下のように行うことができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する。

ゲノムDNAの塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子(例えば、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子)を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、染色体上の標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、上記1の(1)の(a)に記載のゲノムDNAの調製方法などがあげられる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 110、111、112 および 113 に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られる N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 55 に記載の塩基配列があげられる。

染色体上の標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES 細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、置換型、挿入型いずれでも用いることができる。

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述 3 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES 細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリ A 選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノム DNA に対するサザンハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)] や PCR 法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] 等があげられる。

(c) RDO 方法による本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RDO 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関

与する酵素の cDNA あるいはゲノム DNA を上記 1 の (1) の (a) に記載の方法を用い、調製する。

調製した cDNA あるいはゲノム DNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さの RDO のコンストラクトを設計し合成する。

合成した RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

各種宿主細胞への RDO の導入には、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) の (a) に記載の cDNA の調製方法などがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) の (b) に記載のゲノム DNA の調製方法などがあげられる。

DNA の塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにサブクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガ

ー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377DNA シーケンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

RDO は、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。

RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997) 等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、前記 1 の (1) の (a) に記載の、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述 1 の (5) に記載の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述 4 または後述 5 に記載の産生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

RDO は、Science, 273, 1386 (1996); Nature Medicine, 4, 285 (1998); Hepatology, 25, 1462 (1997); Gene Therapy, 5, 1960 (1999); Gene Therapy, 5, 1960 (1999); J. Mol. Med., 75, 829 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8774 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8768 (1999); Nuc. Acids. Res., 27, 1323 (1999); Invest. Dermatol., 111, 1172 (1998); Nature Biotech., 16, 1343 (1998); Nature Biotech., 18, 43 (2000); Nature Biotech., 18, 555 (2000) 等の記載に従って設計することができる。

(d) RNAi 法による本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標

的とし、RNAi 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を上記 1 の (1) の (a) に記載の方法を用い、cDNA を調製する。

調製した cDNA の塩基配列を決定する。

決定した cDNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さの RNAi 遺伝子を実験する。

該 RNAi 遺伝子を細胞内で発現させるために、調製した cDNA の断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生した融合蛋白質分子または細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体への組み込みが可能で、設計した RNAi 遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述 2 に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述 2 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を調製する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載された cDNA の調製方法などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計した RNAi 遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

RNAi 遺伝子は、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。 RNAi 遺伝子のコンストラクトは、[Nature, 391, 806 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15502 (1998); Nature, 395, 854 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5049 (1999); Cell, 95, 1017 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1451 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13959 (1998); Nature Cell Biol., 2, 70 (2000)] 等の記載に従って設計することができる。

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、Nature Genet., 25, 35 (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミン

の6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生した融合蛋白質分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿まれた外来遺伝子に突然変異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

外来遺伝子としては、宿主細胞のDNAに変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述2に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項1の(5)に記載の方法があげられる。産生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

(2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチ

ルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fxなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

これらの酵素は、基質特異性を有したある特定の反応を触媒する酵素であり、このような基質特異性を有した触媒作用を有する酵素の活性中心を破壊することで、これらの酵素のドミナントネガティブ体を作製することができる。標的とする酵素のうち、GMDを例として、そのドミナントネガティブ体に作製について具体的に以下に述べる。

大腸菌由来の GMD の立体構造を解析した結果、4つのアミノ酸 (133 番目のトレオニン、135 番目のグルタミン酸、157 番目のチロシン、161 番目のリシン) が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている [Structure, 8, 2 (2000)]。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら4つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMD の補酵素 NADP や基質である GDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMD の酵素活性を担うこれら4つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来の GMD のドミナントネガティブ体の作製の結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO 細胞由来の GMD (配列番号2) では、155 番目のトレオニン、157 番目のグルタミン酸、179 番目のチロシン、183 番目のリシンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997)等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子 (以下、ドミナントネガティブ体遺伝

子と略記する)を用い、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997)、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を調製する。

調製したドミナントネガティブ体遺伝子の全長 DNA をもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長 DNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生した融合蛋白質分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述 2 に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述 2 に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述2に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 1 (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

(3) 酵素に突然変異を導入する手法

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、F_x などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

酵素に突然変異を導入する方法としては、1) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産した融合蛋白質分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として所望の細

胞株を選択する方法などがあげられる。

突然変異誘発処理としては、親株の細胞の DNA に点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。

具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第三版(朝倉書店)日本組織培養学会編(1996)、Nature Genet., 24, 314, (2000)等に記載の方法を挙げることができる。

自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体を挙げるることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。産生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項の 1 の (5) に記載の方法があげられる。

(4) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンス RNA/DNA 技術 [バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術 [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)] 等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位

にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項1の(5)に記載の方法があげられる。産生した融合蛋白質分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

(5) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

本発明の融合蛋白質組成物を作製するために用いる宿主細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、Somatic Cell Mol. Genet., 12, 51 (1986)等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (LensCulinaris由来の Lentil Agglutinin) エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba由来の Agglutinin)、ヒヨコチャワンタケレクチン AAL (Aleuriaaurantia由来の Lectin) 等を挙げることができる。

具体的には、1 μ g/mL~1mg/mLの濃度の上述のレクチンを含む培地で1日~2週間、好ましくは1日~1週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養容器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、本発明の N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。

2. 融合蛋白質組成物の製造方法

融合蛋白質組成物は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997)、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996 等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

本発明の融合蛋白質分子の全長 cDNA を調製し、該融合蛋白質分子をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、発現ベクターを作製する。

該発現ベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、融合蛋白質組成物を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、融合蛋白質を発現できるものであればいずれも用いることができる。

融合蛋白質分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が失活した細胞を選択するか、または前述 1 に示された種々の人為的手法により得られた細胞を宿主細胞として用いることもできる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、目的とする融合蛋白質分子をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

cDNA は、前記 1. の (1) の (a) に記載の cDNA の調製方法に従い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞より、目的とする融合蛋白質分子をコードする cDNA に特異的なプローブまたはプライマー等を用いて調製することができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、

YEpl24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイペロミセス属、トリコスボロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius 等をあげることができる。

発現ベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriology, 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 75, 1929 (1978)] に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平 3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3 [特開平 2-227075]、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen 社)、pREP4 (Invitrogen 社)、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210 等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の IE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開昭 63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受

精卵細胞等をあげることができる。

発現ベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 [特開平 2-227075]、リボフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [特許第 2606856、特許第 2517813]、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ 4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編 (1994)]、ウイルスベクター法 [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)] 等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997)、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988) 等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、発現ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともに Invitrogen 社) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスである Autographa californica nuclear polyhedrosis virus 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997)、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (Invitrogen 社) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記発現ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リボフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター、イネアクチン 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファアルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

発現ベクターの導入方法としては、植物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) [特開昭 59-140885、特開昭 60-70080、W094/00977]、エレクトロポレーション法 [特開昭 60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [日本特許第 2606856、日本特許第 2517813] 等をあげることができる。

融合蛋白質遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質の発現等を行うことができる。

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、導入した遺伝子によって糖あるいは糖鎖が付加された融合蛋白質組成物を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、融合蛋白質組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いるこ

とができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は 15～40℃がよく、培養時間は、通常 16 時間～7 日間である。培養中の pH は 3～9 に保持する。pH の調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド等を、trp プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)]、Whitten 培地 [発生工学実験マニュアルトランスジェニック・マウスの作り方 (講談社) 勝木元也編 (1987)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH6～8、30～40℃、5%CO₂ 存在下等の条件下で 1～7 日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (Pharmingen 社)、Sf-900 II SFM 培地 (Life Technologies 社)、ExCell1400、ExCell405 (いずれも JRH Biosciences 社)、Grace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH6~7、25~30℃等の条件下で、1~5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH5~9、20~40℃の条件下で 3~60 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、融合蛋白質分子をコードする DNA を組み込んだ発現ベクターを保持する酵母、動物細胞、昆虫細胞あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該培養物より融合蛋白質組成物を採取することにより、融合蛋白質組成物を製造することができる。

融合蛋白質遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

融合蛋白質組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる融合蛋白質分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

融合蛋白質組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 8227 (1989); Genes Develop., 4, 1288(1990)]、または特開平 05-336963、特開平 06-823021 等に記載の方法を準用することにより、該融合蛋白質組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、融合蛋白質分子をコードする DNA、および融合蛋白質分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードする DNA を挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入の後に融合蛋白質分子を発現させることにより、目的とする融合蛋白質組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平 2-227075 に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

融合蛋白質分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された融合蛋白質組成物は、例えば融合蛋白質組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学 (株) 製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia 社) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、融合蛋白質組成物の精製標品を得ることができる。

また、融合蛋白質組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として融合蛋白質組成物の不溶体を回収する。回収した融合蛋白質組成物の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該融合蛋白質組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該融合蛋白質組成物の精製標品を得ることができる。

融合蛋白質組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該融合蛋白質組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、融合蛋白質組成物の精製標品を得ることができる。

以下に、本発明の融合蛋白質組成物の具体的な製造方法について説明する。

(1) 融合蛋白質発現用ベクターの構築

融合蛋白質発現用ベクターとは、ヒト抗体の CH 等をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の CH などをコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の C 領域としては、任意のヒト抗体の CH および CL であることができ、例えば、ヒト抗体の H 鎖の IgG1 サブクラスの C 領域（以下、hC γ 1 と表記する）及びヒト抗体の L 鎖の κ クラスの C 領域（以下、hC κ と表記する）等があげられる。

ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成るゲノム DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の定常領域をコードする遺伝子を組み込み発現できる発現ベクターが用いられる。例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニー Maus 白血病ウイルスの LTR [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)]、免疫グロブリン H 鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)] とエンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)] 等があげられる。

融合蛋白質発現用ベクターは、発現させる融合蛋白質の形状に合った形のベクターを用いればよく、例えば、抗体の Fc 領域に抗体 H 鎖及び L 鎖の両方を用いる場合には、抗体 H 鎖及び L 鎖がそれぞれ別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができる。融合蛋白質発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での融合蛋白質の H 鎖及び L 鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]。タンデム型の融合蛋白質発現ベクターとしては、pKANTEX93 [Mol. Immunol., 37, 1035 (2000)]、pEE18 [Hybridoma, 17, 559 (1998)] などがあげられる。

構築した融合蛋白質発現用ベクターは、本発明の融合蛋白質の動物細胞での発現に使用で

きる。

(2) 結合性蛋白質をコードする cDNA の取得

結合性蛋白質をコードする cDNA は以下のようにして取得することができる。

例えば、結合性蛋白質が一本鎖抗体である場合には、抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として用い、cDNA を合成する。合成した cDNA をファージ或いはプラスミド等のベクターに挿入して cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体の C 領域或いは V 領域をコードする DNA をプローブとして用い、VH をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及び VL をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体の VH および VL の全塩基配列を決定し、塩基配列より VH および VL の全アミノ酸配列を推定する。

また、結合性蛋白質が、蛋白質性のリガンドまたは可溶性の受容体である場合には、該結合性蛋白質を発現することが知られている細胞株または組織から、上記と同様の方法で cDNA を取得することができる。

細胞または組織から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)]、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞から mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit

(Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) 等があげられる。

cDNA の合成及び cDNA ライブラリー作製法としては、常法[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+)

[Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、 λ ZAP II (Stratagene 社製)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、 λ ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia 社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] 及び pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、大腸菌の株としては、XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)]、C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] 及び JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーからの目的の結合性蛋白質をコードする cDNA クローンを選択する方法としては、アイソトープ或いは蛍光などで標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor Lab. Press NewYork, 1989] により選択することができる。また、プライマーを調製し、cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989 ; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34] により目的の結合性蛋白質をコードする cDNA を調製することもできる。

上記方法により選択された cDNA を、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377 DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより該 cDNA の塩基配列を決定することができる。

さらに、結合性蛋白質のアミノ酸配列または該蛋白質をコードする DNA の塩基配列がすでに公知である場合には、以下の方法を用いても製造することができる。

アミノ酸配列が公知である場合には、コドンの使用頻度 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮して該可変

領域をコードする DNA 配列を設計し、設計した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行うことにより DNA を得ることができる。塩基配列が公知である場合には、その情報を基に 100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行うことにより DNA を得ることができる。

(3) 結合性蛋白質のアミノ酸配列の解析

決定した塩基配列から結合性蛋白質の全アミノ酸配列を推定し、既知のデータベース (Genbank、Swiss Prot) で結合性蛋白質の全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、取得した cDNA が目的とする結合性蛋白質の完全長を含んでいるかを確認することができる。

(4) 融合蛋白質をコードする cDNA の構築

融合蛋白質をコードする cDNA は、以下のようにして構築することができる。まず、構築する融合蛋白質の形状に従って、アミノ酸一次配列を設計する。設計したアミノ酸配列は、コドンユセージを考慮に入れて、DNA 配列に変換する。変換した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を設計、合成し、それらを PCR 法により連結させ、目的の DNA 配列を構築することができる。

融合蛋白質の形状によって、結合蛋白質をコードする cDNA のみを上記の方法で作成し、抗体定常領域をコードする cDNA を持つ発現ベクターに導入し、所望の融合蛋白質発現ベクターを構築できる。また、結合性蛋白質と抗体 Fc 領域とが連結した形で cDNA を上記の方法で構築し、適当な発現ベクターのプロモーター下に挿入して、所望の融合蛋白質発現ベクターを構築することも可能である。

(5) 融合蛋白質発現ベクターの構築

本項 2 の (1) に記載の融合蛋白質発現用ベクターのヒト抗体の CH 等をコードする遺伝子上流に、本項 2 の (4) で構築した融合蛋白質をコードする cDNA を挿入し、融合蛋白質発現ベクターを構築することができる。例えば、本項 2 の (4) で融合蛋白質を構築する際に用いる合成 DNA のうち、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項 2 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH 及び CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入し、融合蛋白質発現ベ

クターを構築することができる。このとき、必要に応じてヒト抗体の CH あるいは CL をコードする遺伝子は所望のアミノ酸配列をコードする領域のみを残して、発現ベクターとすることもできる。

(6) 融合蛋白質の安定的生産

本項 2 の (4) および (5) に記載の融合蛋白質発現ベクターを適当な動物細胞に導入することにより融合蛋白質を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞への融合蛋白質発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平 2-257891; Cytotechnology, 3, 133 (1990)] 等があげられる。

融合蛋白質発現ベクターを導入する動物細胞としては、融合蛋白質を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞である NS0 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ細胞 YB2/0 細胞、IR983F 細胞、シリアンハムスター腎臓由来である BHK 細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞である CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞等があげられる。

融合蛋白質発現ベクターの導入後、融合蛋白質を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 硫酸塩 (以下、G418 と表記する ; SIGMA 社製) 等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (日水製薬社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302 培地 (JRH 社製)、IMDM 培地 (GIBCO BRL 社製)、Hybridoma-SFM 培地 (GIBCO BRL 社製)、またはこれら培地に牛胎児血清 (以下、FCS と表記する) 等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に融合蛋白質を生成蓄積させることができる。培養上清中の融合蛋白質の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法 [以下、ELISA 法と表記する ; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1998)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] 等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、DHFR 遺伝子増幅系等を利用して融合蛋白質の生産量を上昇させることができる。

融合蛋白質は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することがで

きる [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)]。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化融合蛋白質の分子量は、SDS 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [以下、SDS-PAGE と表記する ; Nature, 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] 等で測定することができる。

以上、動物細胞を宿主とした融合蛋白質組成物の製造方法を示したが、上述したように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても動物細胞と同様の方法により融合蛋白質組成物を製造することができる。

すでに宿主細胞が融合蛋白質組成物を発現する能力を有する場合には、上記 1 に記載した方法を用いて融合蛋白質組成物を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする融合蛋白質組成物を精製することにより、本発明の融合蛋白質組成物を製造することができる。

3. 融合蛋白質組成物の活性評価

精製した融合蛋白質組成物の蛋白量、抗原との結合活性あるいは ADCC 活性を測定する方法としては、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996) 等に記載の公知の方法を用いることができる。

その具体的な例としては、融合蛋白質組成物が融合蛋白質の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性は ELISA 法及び蛍光抗体法 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞傷害活性は、CDC 活性、ADCC 活性等を測定することにより、評価することができる [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)]。

ADCC 活性は、NK 細胞、好中球、単球、マクロファージなどのエフェクター細胞の活性化の結果、生じると考えられており、中でも NK 細胞が、主要な役割を果たしている [Blood, 76, 2421

(1990)、Trends in Immunol., 22, 633 (2001)、Int. Rev. Immunol., 20, 503 (2001)]。

NK細胞上に発現しているFc γ RはFc γ RIIIaであり、従って、抗体のADCC活性はFc γ RIIIaに対する結合性の強さと相関するので、融合蛋白質組成物のFc γ RIIIaに対する結合性から、融合蛋白質組成物の有するADCC活性を予測することができる。融合蛋白質組成物のFc γ RIIIaに対する結合性を測定する方法は、ELISA法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1998)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996] に類似の方法で測定することができる。

具体的には、ELISAプレートに固定化したFc γ RIIIaに融合蛋白質組成物を反応させ、Fc γ RIIIaに結合した融合蛋白質組成物を検出する方法や、ELISAプレートに固定化した抗原等の基質に融合蛋白質組成物抗体を結合させ、次いで抗原等の基質に結合した融合蛋白質組成物に標識化したFc γ RIIIaを反応、検出することにより融合蛋白質組成物のFc γ RIIIaに対する結合性を評価することができる。

Fc γ RIIIaは、上記1項に記載の方法によりヒト末梢血などからcDNAを取得し、適当な発現ベクターに組み込み発現させ、取得できる。Fc γ RIIIaを発現させる場合には、適当なタグ分子と融合させて、標識化することができる。

また、融合蛋白質組成物のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

4. 融合蛋白質組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた融合蛋白質組成物の糖鎖構造は、通常の糖蛋白質の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、融合蛋白質分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

(1) 中性糖・アミノ糖組成分析

融合蛋白質組成物の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

具体的な方法として、Dionex社製糖組成分析装置を用いる方法があげられる。BioLCはHPAEC-PAD (high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric

detection) 法 [J. Liq. Chromatogr., 6, 1577 (1983)] によって糖組成を分析する装置である。

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法 [Agric. Biol. Chem., 55(1), 283 (1991)] に従って酸加水分解した試料を2-アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、HPLC 分析して組成比を算出することができる。

(2) 糖鎖構造解析

融合蛋白質分子の糖鎖の構造解析は、2次元糖鎖マップ法 [Anal. Biochem., 171, 73 (1988)、生物化学実験法 23-糖蛋白質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989年)] により行うことができる。2次元糖鎖マップ法は、例えば、X軸には逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

具体的には、融合蛋白質組成物をヒドラジン分解して、融合蛋白質組成物から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PA と略記する) による糖鎖の蛍光標識 [J. Biochem., 95, 197 (1984)] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰の PA 化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa 社製)、文献 [Anal. Biochem., 171, 73 (1988)] とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

さらに各糖鎖の MALDI-TOF-MS などの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

5. 融合蛋白質分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

融合蛋白質組成物は、融合蛋白質の Fc 領域に結合する糖鎖構造が異なった融合蛋白質分子から構成されている。本発明の融合蛋白質組成物は、Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 100% であり、高い ADCC 活性を示す特徴を有している。このような融合蛋白質組成物は、上記 4. に記載の融合蛋白質組成物の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いた融合蛋白質分子の糖鎖構造の識別は、文献

[Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., (1995); 酵素免疫測定法, 第3版, 医学書院 (1987); 改訂版, 酵素抗体法, 学際企画 (1985)] 等に記載のウエスタン染色、RIA (Radioimmunoassay)、VIA (Viroimmunoassay)、EIA

(Enzymoimmunoassay)、FIA (Fluoroimmunoassay)、MIA (Metalloimmunoassay) などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

融合蛋白質組成物を構成する融合蛋白質分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料である融合蛋白質組成物を反応させる。次に、標識したレクチンと融合蛋白質分子の複合体の量を測定する。

融合蛋白質分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA (T. vulgaris 由来の wheat-germ agglutinin)、ConA (C. ensiformis 由来の concanavalin A)、RIC (R. communis 由来の毒素)、L-PHA (P. vulgaris 由来の leukoagglutinin)、LCA (L. culinaris 由来の lentil agglutinin)、PSA (P. sativum 由来の Pea lectin)、AAL (Aleuria aurantia Lectin)、ACL (Amaranthus caudatus Lectin)、BPL (Bauhinia purpurea Lectin)、DSL (Datura stramonium Lectin)、DBA (Dolichos biflorus Agglutinin)、EBL (Elderberry Balk Lectin)、ECL (Erythrina cristagalli Lectin)、EEL (Euonymus europaeus Lectin)、GNL (Galanthus nivalis Lectin)、GSL (Griffonia simplicifolia Lectin)、HPA (Helix pomatia Agglutinin)、HHL (Hippeastrum Hybrid Lectin)、Jacalin、LTL (Lotus tetragonolobus Lectin)、LEL (Lycopersicon esculentum Lectin)、MAL (Maackia amurensis Lectin)、MPL (Maclura pomifera Lectin)、NPL (Narcissus pseudonarcissus Lectin)、PNA (Peanut Agglutinin)、E-PHA (Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin)、PTL (Psophocarpus tetragonolobus Lectin)、RCA (Ricinus communis Agglutinin)、STL (Solanum tuberosum Lectin)、SJA (Sophora japonica Agglutinin)、SBA (Soybean Agglutinin)、UEA (Ulex europaeus Agglutinin)、VVL (Vicia villosa Lectin)、WFA (Wisteria floribunda Agglutinin)があげられる。

N-グルコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin) エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒヨコチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) を挙げることができる。

6. 本発明の融合蛋白質組成物の利用

本発明の融合蛋白質組成物は高い ADCC 活性を有する。高い ADCC 活性を有する融合蛋白質は、腫瘍、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患、循環器疾患、微生物感染を伴う疾患などの各種疾患の予防および治療において有用である。

腫瘍としては、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病等の急性白血病、リンパ腫、成人 T 細胞白血病・リンパ腫、NK/T 細胞性リンパ腫などの T 細胞性腫瘍、慢性白血病などの白血病、骨髄腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫などの血液腫瘍および癌などの悪性腫瘍が含有される。

炎症性疾患としては、急性あるいは慢性の気道過敏性や気管支喘息、アトピー性皮膚炎を含むアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症などの炎症性疾患、慢性副鼻腔炎、Churg-Strauss 症候群、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患などの炎症性疾患が包含される。

自己免疫疾患としては、慢性関節リウマチ、若年性関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、全身性硬化症、多発性筋炎、ギラン・バレー症候群、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫溶血性貧血、メモリー T 細胞による抗原提示が関与する免疫システム異常に起因する疾患が包含される。メモリー T 細胞とは、主に CD45RO 陽性を示す活性化 T 細胞を示し、抗原提示細胞 (APC) より抗原の情報を受け取り、免疫システムを活性化する細胞群を示す。

循環器疾患としては、動脈硬化症、虚血性心疾患、心臓弁膜症、高血圧、脳卒中、腎不全、大動脈瘤、閉塞性動脈硬化症、原発性肺高血圧症が含有される。

微生物感染を伴う疾患としては、レトロウイルスのヒト T 細胞ウイルス I 型 (HTLV-I)、肝炎ウイルス、エプスタイン-バー (EB) ウイルス、カポジ肉腫関連ウイルス、肝炎ウイルス等の感染によるウイルス性感染症、ブドウ球菌、レンサ球菌、肺炎球菌等の感染による細菌性感染症、白癬菌等の感染による真菌感染症が含有される。

本発明の融合蛋白質組成物は高い細胞傷害活性を有するため、従来の融合蛋白質組成物では治療することができない、上述の腫瘍、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患、循環器疾患、微生物感染を伴う疾患などの各種疾患の患者を治療することができる。

以下に、本発明の融合蛋白質において、結合性蛋白質としての抗体の結合性断片に使用できる腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、または微生物感染に関連する抗原を認識する抗体の具体例を述べる。

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗GD2抗体 [Anticancer Res., 13, 331 (1993)]、抗GD3抗体 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 260 (1993)]、抗GM2抗体 [Cancer Res., 54, 1511 (1994)]、抗HER2抗体 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285 (1992)]、抗CD52抗体 [Nature, 332, 323 (1988)]、抗MAGE抗体 [British J. Cancer, 83, 493 (2000)]、抗HM1.24抗体 [Molecular Immunol., 36, 387 (1999)]、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 [Cancer, 88, 2909 (2000)]、抗FGF8抗体 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911 (1989)]、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗FGF8受容体抗体 [J. Biol. Chem., 265, 16455-16463 (1990)]、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体 [J. Neurosci. Res., 40, 647 (1995)]、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 [J. Neurosci. Res., 40, 647 (1995)]、抗PMSA抗体 [J. Urology, 160, 2396 (1998)]、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 [Cancer Res., 57, 4593 (1997)] または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 [Oncogene, 19, 2138 (2000)] などがあげられる。

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン6抗体 [Immunol. Rev., 127, 5 (1992)]、抗インターロイキン6受容体抗体 [Molecular Immunol., 31, 371 (1994)]、抗インターロイキン5抗体 [Immunol. Rev., 127, 5 (1992)]、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体 [Cytokine, 3, 562 (1991)]、抗インターロイキン4受容体抗体 [J. Immunol. Meth., 217, 41 (1998)]、抗腫瘍壊死因子抗体 [Hybridoma, 13, 183 (1994)]、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 [Molecular Pharmacol., 58, 237 (2000)]、抗CCR4抗体 [Nature, 400, 776-780, 1999]、抗ケモカイン抗体 [J. Immunol. Meth., 174, 249 (1994)] または抗ケモカイン受容体抗体 [J. Exp. Med., 186, 1373 (1997)] などがあげられる。

循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、抗GpIIb/IIIa抗体 [J. Immunol., 152, 2968 (1994)]、抗血小板由来増殖因子抗体 [Science, 253, 1129 (1991)]、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 [J. Biol. Chem., 272, 17400 (1997)] または抗血液凝固因子抗体

[Circulation, 101, 1158 (2000)] などがあげられる。

自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、抗自己 DNA 抗体 [Immunol. Letters, 72, 61 (2000)] などがあげられる。

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗 gp120 抗体

[Structure, 8, 385 (2000)]、抗 CD4 抗体 [J. Rheumatology, 25, 2065 (1998)]、抗 CCR5 抗体または抗ペロ毒素抗体 [J. Clin. Microbiol., 37, 396 (1999)] などがあげられる。

上記抗体は、ATCC (The American Type Culture Collection)、理化学研究所細胞開発銀行、工業技術院生命工業技術研究所等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、R&D SYSTEMS 社、PharMingen 社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社から入手することができる。

以下に、本発明の上記の抗体以外の結合性蛋白質と抗体 Fc 領域の融合抗体の具体例を述べる。

炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患に関連する結合性蛋白質の Fc 融合蛋白質の具体例としては、sTNFRII の Fc 融合蛋白質である etanercept (USP5605690)、抗原提示細胞上に発現している LFA-3 の Fc 融合蛋白質である alefacept (USP5914111)、Cytotoxic T Lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) の Fc 融合蛋白質 [J. Exp. Med., 181, 1869 (1995)]、インターロイキン-15 の Fc 融合蛋白質 [J. Immunol., 160, 5742 (1998)]、ファクター VII の Fc 融合蛋白質 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 98, 12180 (2001)]、インターロイキン 10 の Fc 融合蛋白質 [J. Immunol., 154, 5590 (1995)]、インターロイキン 2 の Fc 融合蛋白質 [J. Immunol., 146, 915 (1991)]、CD40 の Fc 融合蛋白質 [Surgery, 132, 149 (2002)]、Flt-3 (fms-like tyrosine kinase) の Fc 融合蛋白質 [Acta. Haemato., 95, 218 (1996)] および OX40 の Fc 融合蛋白質 [J. Leu. Biol., 72, 522 (2002)] などがあげられる。これらの他にも、各種ヒト CD 分子 [CD2、CD30 (TNFRSF8)、CD95 (Fas)、CD106 (VCAM-1)、CD137] や接着分子 [ALCAM (Activated leukocyte cell adhesion molecule)、Cadherins、ICAM (Intercellular adhesion molecule) -1、ICAM-2、ICAM-3]、サイトカイン受容体 (以下、受容体を R と表記する) (IL-4R、IL-5R、IL-6R、IL-9R、IL-10R、IL-12R、IL-13R α 1、IL-13R α 2、IL-15R、IL-21R)、ケモカイン、細胞死誘導シグナル分子 [B7-H1、DR6 (Death receptor 6)、PD-1 (Programmed death-1)、TRAIL R1]、共刺激分子 [B7-1、B7-2、B7-H2、ICOS (Inducible costimulator)]、

増殖因子 (ErbB2、ErbB3、ErbB4、HGFR) あるいは分化誘導因子 (B7-H3)、活性化因子 (NKG2D)、シグナル伝達分子 (gp130) および該結合蛋白質の受容体やリガンドと抗体 Fc 領域との融合蛋白質は多数報告されている。

本発明により得られる融合蛋白質組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、蛋白質製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、Fc 融合蛋白質組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該 Fc 融合蛋白質組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を

刺激せず、かつ該Fc融合蛋白質組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該Fc融合蛋白質組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。

また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり10 μ g/kg~20mg/kgである。

また、Fc融合蛋白質組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC活性測定法、ADCC活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

CDC活性、ADCC活性、抗腫瘍実験は、文献[Cancer Immunology Immunotherapy, 36, 373 (1993); Cancer Research, 54, 1511 (1994)]等記載の方法に従って行うことができる。

図面の簡単な説明

第1図は、プラスミドpKOFUT8Neoの造成工程を示した図である。

第2図は、CHO/DG44細胞のFUT8対立遺伝子を1コピー破壊したヘミノックアウトクローンのゲノムサザンの解析結果を示した図である。レーンは左からそれぞれ分子量マーカー、ヘミノックアウトクローン50-10-104および親株であるCHO/DG44細胞のゲノムサザンである。

第3図は、CHO/DG44細胞のFUT8両対立遺伝子を破壊したダブルノックアウトクローンWK704のゲノムサザン解析結果を示した図である。矢印は、相同組換えが起こった際に検出される陽性断片の検出位置を示す。

第4図は、CHO/DG44細胞のFUT8両対立遺伝子を破壊したダブルノックアウトクローンより薬剤耐性遺伝子を除去したクローンのゲノムサザン解析結果を示した図である。レーンは左からそれぞれ分子量マーカー、ダブルノックアウトクローンの薬剤耐性遺伝子除去クローン4-5-C3、ダブルノックアウトクローンWK704、ヘミノックアウトクローン50-10-104および親株であるCHO/DG44細胞のゲノムサザンである。

第5図は、プラスミドpBSIISK(-)/CC49VHを示した図である。

第6図は、プラスミド pBSIISK(-)/CC49VL を示した図である。

第7図は、プラスミド pKANTEX93/CC49scFv-Fc を示した図である。

第8図は、精製した抗 TAG-72 scFv-Fc(-)および抗 TAG-72 scFv-Fc(+)の還元状態および非還元状態における SDS-PAGE の電気泳動パターンを示した図である。蛋白質の染色は、クーマシーブリリアントブルー (CBB) で行った。

第9図は、各種抗 TAG-72 scFv-Fc の Jurkat 細胞に対する、蛍光抗体法における結合活性を示した図である。横軸に蛍光強度を、縦軸に細胞数をそれぞれ示す。A は抗 TAG-72 scFv-Fc(+), B は抗 TAG-72 scFv-Fc(-), C は陰性対照である KM8404 での結果をそれぞれ示す。1 は抗体非添加、2 は抗体濃度 50 μ g/ml、3 は抗体濃度 2 μ g/ml での結果をそれぞれ示す。

第10図は、各種抗 TAG-72 scFv-Fc の抗原である TAG-72 に対する、ELISA 法における結合活性を示した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における吸光度をそれぞれ示す。●は抗 TAG-72 scFv-Fc(-)、○は抗 TAG-72 scFv-Fc(+), △が陰性対照である KM8404 をそれぞれ示す。

第11図は、各種抗 TAG-72 scFv-Fc の抗原 TAG-72 非存在下での shFc γ RIIIa に対する結合活性を示した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における吸光度をそれぞれ示す。●は抗 TAG-72 scFv-Fc(-)、○は抗 TAG-72 scFv-Fc(+))をそれぞれ示す。A は shFc γ RIIIa(F)、B は shFc γ RIIIa(V)での結果をそれぞれ示す。

第12図は、各種抗 TAG-72 scFv-Fc の抗原 TAG-72 存在下での shFc γ RIIIa に対する結合活性を示した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における吸光度を示す。●は抗 TAG-72 scFv-Fc(-)、○は抗 TAG-72 scFv-Fc(+))をそれぞれ示す。A は shFc γ RIIIa(F)、B は shFc γ RIIIa(V)での結果をそれぞれ示す。

第13図は、各種抗 TAG-72 scFv-Fc の Jurkat 細胞および Raji 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における ADCC 活性 (%) をそれぞれ示す。●は抗 TAG-72 scFv-Fc(-)、○は抗 TAG-72 scFv-Fc(+))をそれぞれ示す。A は Jurkat 細胞、B は Raji 細胞での結果をそれぞれ示す。

第14図は、プラスミド pNUTS の造成工程を示した図である。

第15図は、プラスミド pNUTS/scFvM-Fc の造成工程を示した図である。

第16図は、精製した各種 scFv の Fc 融合蛋白質の還元状態および非還元状態における SDS-PAGE の電気泳動パターンを示した図である。蛋白質の染色は、クーマシーブリアントブルー(CBB)で行った。レーン1は、抗TAG-72 scFv-Fc(-)を、レーン2は、抗TAG-72 scFv-Fc(+)を、レーン3は、抗MUC1 scFv-Fc(-)を、レーン4は、抗MUC1 scFv-Fc(+)を、レーン5は、抗MUC1 抗TAG72 scFvM-scFvT-Fc(-)を、レーン6は、抗TAG-72 抗MUC1 scFvM-scFvT-Fc(+)を、レーン7は、抗TAG-72 抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)を、レーン8は、抗MUC1 抗TAG-72 scFvT-scFvM-Fc(+)をそれぞれ示す。

第17図は、各種抗MUC1 scFv-FcのT47D細胞またはRaji細胞に対する、蛍光抗体法における結合活性を示した図である。横軸に蛍光強度を、縦軸に細胞数をそれぞれ示す。AはT47D細胞に、BはRaji細胞に対する結果をそれぞれ示す。1は50 μ g/mlの抗MUC1 scFv-Fc(-)、2は50 μ g/mlの抗MUC1 scFv-Fc(+)、3はscFv-Fc非添加での結果をそれぞれ示す。

第18図は、各種抗MUC1 scFv-Fcの抗原であるMUC1に対する、ELISA法における結合活性を示した図である。横軸に抗MUC1 scFv-Fc融合蛋白質の濃度を、縦軸に吸光度をそれぞれ示す。●は抗MUC1 scFv-Fc(-)を、○は抗MUC1 scFvM-Fc(+)をそれぞれ示す。AはMUC1を、Bは陰性対照であるTAG-72を抗原として用いた結果をそれぞれ示す。

第19図は、各種抗MUC1 scFv-Fcの抗原MUC1非存在下でのshFc γ RIIIaに対する結合活性を示した図である。横軸に抗MUC1 scFv-Fc融合蛋白質の濃度を、縦軸に吸光度をそれぞれ示す。●は、抗MUC1 scFv-Fc(-)、○は、抗MUC1 scFv-Fc(+)をそれぞれ示す。Aは、shFc γ RIIIa(V)での、Bは、shFc γ RIIIa(F)での結果をそれぞれ示す。

第20図は、各種抗MUC1 scFv-Fcの抗原MUC1存在下でのshFc γ RIIIa(V)に対する結合活性を示した図である。横軸に抗MUC1 scFv-Fc融合蛋白質の濃度を、縦軸に吸光度をそれぞれ示す。●は、抗MUC1 scFv-Fc(-)、○は、抗MUC1 scFv-Fc(+)をそれぞれ示す。Aは、shFc γ RIIIa(V)での、Bは、shFc γ RIIIa(F)での結果をそれぞれ示す。

第21図は、抗MUC1 scFv-FcのADCC活性を示した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度におけるADCC活性をそれぞれ示す。●は抗MUC1 scFv-Fc(-)、○は抗MUC1 scFv-Fc(+)をそれぞれ示す。AはT47D細胞、BはRaji細胞での結果をそれぞれ示す。

第22図は、プラスミドpNUTS/scFvM-scFvT-Fcの造成工程を示した図である。

第23図は、プラスミドpNUTS/scFvT-scFvM-Fcの造成工程を示した図である。

第24図は、各種scFv₂-FcのRaji細胞、Jurkat細胞またはT47D細胞に対する、蛍光抗体法における結合活性を示した図である。横軸に蛍光強度を、縦軸に細胞数をそれぞれ示す。AはRaji細胞に、BはJurkat細胞に、CはT47D細胞に対する結果を示す。1は75 μ g/mLのscFvM-scFvT-Fc(-)、2は75 μ g/mLのscFvM-scFvT-Fc(+)、3は75 μ g/mLのscFvT-scFvM-Fc(-)、4は75 μ g/mLのscFvT-scFvM-Fc(+)、5はscFv₂-Fc非添加での結果をそれぞれ示す。

第25図は、各種scFv₂-FcのTAG-72に対する、ELISA法における結合活性を示した図である。横軸にscFv₂-Fc濃度を、縦軸に各scFv₂-Fc濃度における吸光度をそれぞれ示す。▲は抗MUC1抗TAG-72scFvM-scFvT-Fc(-)、△は抗MUC1抗TAG-72scFvM-scFvT-Fc(+)、●は抗TAG-72抗MUC1scFvT-scFvM-Fc(-)、○は抗TAG-72抗MUC1scFvT-scFvM-Fc(+)をそれぞれ示す。Aは各種抗TAG-72抗MUC1scFvM-scFvT-Fc、Bは各種抗TAG-72抗MUC1scFvT-scFvM-Fcでの結果をそれぞれ示す。

第26図は、各種scFv₂-FcのMUC1に対する、ELISA法における結合活性を示した図である。横軸にscFv₂-Fc濃度を、縦軸に各scFv₂-Fc濃度における吸光度をそれぞれ示す。▲は抗MUC1抗TAG-72scFvM-scFvT-Fc(-)、△は抗MUC1抗TAG-72scFvM-scFvT-Fc(+)、●は抗TAG-72抗MUC1scFvT-scFvM-Fc(-)、○は抗TAG-72抗MUC1scFvT-scFvM-Fc(+)をそれぞれ示す。Aは各種抗TAG-72抗MUC1scFvM-scFvT-Fc、Bは各種抗TAG-72抗MUC1scFvT-scFvM-Fcでの結果をそれぞれ示す。

第27図は、抗MUC1抗TAG-72scFvM-scFvT-FcのshFc γ R111aに対する結合活性を示した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における吸光度をそれぞれ示す。▲は抗MUC1抗TAG-72scFvM-scFvT-Fc(-)、△は抗MUC1抗TAG-72scFvM-scFvT-Fc(+)をそれぞれ示す。AはshFc γ R111a(V)、BはshFc γ R111a(F)での結果をそれぞれ示す。

第28図は、抗TAG-72抗MUC1scFvT-scFvM-Fcの抗原非存在下でのshFc γ R111aに対する結合活性を示した図である。横軸にサンプル濃度を、縦軸に各サンプル濃度における吸光度をそれぞれ示す。●は抗TAG-72抗MUC1scFvT-scFvM-Fc(-)、○は抗TAG-72抗MUC1scFvT-scFvM-Fc(+)をそれぞれ示す。AはshFc γ R111a(V)、BはshFc γ R111a(F)での結果をそれぞれ示す。

第29図は、各種scFv₂-Fcの抗原存在下でのshFc γ R111a(V)に対する結合活性を示した図である。▲は抗MUC1抗TAG-72scFvM-scFvT-Fc(-)、△は抗MUC1抗TAG-72scFvM-scFvT-Fc(+)

●は抗TAG-72抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)、○は抗TAG-72抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+)をそれぞれ示す。AはTAG-72存在下での、BはMUC1存在下での結果をそれぞれ示す。

第30図は、各種 scFv₂-Fc の Jurkat 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。横軸に scFv₂-Fc 濃度を、縦軸に各 scFv₂-Fc 濃度における ADCC 活性をそれぞれ示す。図の A 中の▲は抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-)、△は抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+)を、図の B 中の●は抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)、○は抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+)をそれぞれ示す。

第31図は、各種 scFv₂-Fc の T47D 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。横軸に scFv₂-Fc 濃度を、縦軸に各 scFv₂-Fc 濃度における ADCC 活性をそれぞれ示す。図の A 中の▲は抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-)、△は抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+)を、図の B 中の●は抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)、○は抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+)をそれぞれ示す。

第32図は、各種 scFv₂-Fc の Raji 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。横軸に scFv₂-Fc 濃度を、縦軸に各 scFv₂-Fc 濃度における ADCC 活性をそれぞれ示す。図の A 中の▲は抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-)、△は抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+)を、図の B 中の●は抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)、○は抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+)をそれぞれ示す。

第33図は、プラスミド pBsIISK(-)/sTNFR_{II}-1 を示した図である。

第34図は、プラスミド pBsIISK(-)/sTNFR_{II}-2 を示した図である。

第35図は、プラスミド pBsIISK(-)/sTNFR_{II}-Fc を示した図である。

第36図は、プラスミド pKANTEX93/sTNFR_{II}-Fc を示した図である。

第37図は、精製した sTNFR_{II}-Fc(-)および sTNFR_{II}-Fc(+)の SDS-PAGE の還元状態および非還元状態における電気泳動パターンを示した図である。蛋白質の染色は、クーマシーブリリアントブルー (CBB) で行った。

第38図は、各種 sTNFR_{II}-Fc の抗 TNFR_{II} 抗体に対する、ELISA 法における結合活性を示した図である。横軸に sTNFR_{II}-Fc 濃度を、縦軸に各 sTNFR_{II}-Fc 濃度における抗 TNFR_{II} 抗体との結合活性をそれぞれ示す。○は sTNFR_{II}-Fc(+), ●は sTNFR_{II}-Fc(-)をそれぞれ示す。

第39図は、各種 sTNFR_{II}-Fc の shFcγRIIIa に対する結合活性を示した図である。横軸に

sTNFR^{II}-Fc 濃度を、縦軸に各 sTNFR^{II}-Fc 濃度における結合活性をそれぞれ示す。○は sTNFR^{II}-Fc(+), ●は sTNFR^{II}-Fc(-)をそれぞれ示す。Aは shFc γ R^{III}a(F)、Bは shFc γ R^{III}a(V)での結果をそれぞれ示す。

第40図は、各種 sTNFR^{II}-Fc のマウス TNF- α に対する中和活性を示した図である。横軸に sTNFR^{II}-Fc 濃度を、縦軸に各 sTNFR^{II}-Fc 濃度における TNF- α 中和活性をそれぞれ示す。●は sTNFR^{II}-Fc(-)、○は sTNFR^{II}-Fc(+)での結果をそれぞれ示す。

第41図は、プラスミド pKANTEX Δ 1-12TNF- α の造成工程を示した図である。

第42図は、TNF- α /EL4 および親株である EL4 細胞の膜型ヒト TNF- α の発現をフローサイトメーターを用いて解析した図である。

第43図は、各種 sTNFR^{II}-Fc の TNF- α /EL4 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。横軸に sTNFR^{II}-Fc 濃度を、縦軸に各 sTNFR^{II}-Fc 濃度における ADCC 活性 (%) をそれぞれ示す。●が sTNFR^{II}-Fc(-)、○が sTNFR^{II}-Fc(+)の活性をそれぞれ示す。

第44図は、プラスミド pBsIISK(-)/LFA-3-Fc を示した図である。

第45図は、プラスミド pKANTEX93/LFA-3-Fc を示した図である。

第46図は、精製した LFA-3-Fc(-)および LFA-3-Fc(+)の還元状態および非還元状態における SDS-PAGE の電気泳動パターンを示した図である。蛋白質の染色は、クーマシーブリリアントブルー (CBB) で行った。

第47図は、各種 LFA-3-Fc の CD2 発現細胞株に対する、蛍光抗体法における結合活性を示した図である。横軸に LFA-3-Fc 濃度を、縦軸に各 LFA-3-Fc 濃度における平均蛍光強度をそれぞれ示す。●は LFA-3-Fc(-)、○は LFA-3-Fc(+)をそれぞれ示す。

第48図は、各種 LFA-3-Fc の shFc γ R^{III}a に対する結合活性を示した図である。横軸に LFA-3-Fc 濃度を、縦軸に各 LFA-3-Fc 濃度における結合活性をそれぞれ示す。○は LFA-3-Fc(+), ●は LFA-3-Fc(-)の活性をそれぞれ示す。Aは shFc γ R^{III}a(F)型、Bは shFc γ R^{III}a(V)型での結果をそれぞれ示す。

第49図は、各種 LFA-3-Fc の Jurkat 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。横軸は LFA-3-Fc 濃度を、縦軸は各 LFA-3-Fc 濃度における ADCC 活性 (OD490) をそれぞれ示す。●は LFA-3-Fc(-)、○は LFA-3-Fc(+)をそれぞれ示す。

以下に、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

実施例 1

ゲノム上の $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ（以下、FUT8 と表記する）両対立遺伝子を破壊した CHO/DG44 細胞の造成

FUT8 両対立遺伝子の翻訳開始コドンを含むゲノム領域を欠失させた CHO/DG44 細胞株を以下の手順で造成した。

1. チャイニーズハムスターFUT8 遺伝子のエクソン 2 を含むターゲティングベクター pKOFUT8Neo の構築

WO02/31140 の実施例 13 の第 1 項に記載の方法で構築されたチャイニーズハムスターFUT8 遺伝子のエクソン 2 を含むターゲティングベクター pKOFUT8Puro および pKSelectNeo (Lexicon 社製)を用いて、以下のようにして pKOFUT8Neo を構築した。

pKSelectNeo (Lexicon 社製)を制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BI0101 社製)を用いてネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約 1.6Kb の AscI 断片を回収した。

次に、pKOFUT8Puro を制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製)で消化後、大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製)により、DNA 断片の末端を脱リン酸化させた。反応後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を用いて、DNA 断片を精製した。

上記で得た pKSelectNeo 由来の AscI 断片 (約 1.6Kb)0.1 μ g と pKOFUT8Puro 由来の AscI 断片 (約 10.1Kb) 0.1 μ g に滅菌水を加えて 5 μ L とし、Ligation High (東洋紡社製) 5 μ L を加えて 16°C で 30 分間反応させることにより、連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより各々プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。このようにして第 1 図に示した pKOFUT8Neo を得た。pKOFUT8Neo は CHO 細胞の FUT8 遺伝子ヘミノックアウト細胞株を作製するためのターゲティングベクターとして用いた。

2. ゲノム上の FUT8 遺伝子の 1 コピーを破壊したヘミノックアウト細胞株の作製

(1) ターゲティングベクター-pKOFUT8Neo 導入株の取得

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) を欠損したチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO/DG44 細胞 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555 (1986)] に、本実施例の第 1 項で構築したチャイニーズハムスター FUT8 ゲノム領域ターゲティングベクター-pKOFUT8Neo を以下のようにして導入した。

pKOFUT8Neo を制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) で消化して線状化し、線状化した $4\mu\text{g}$ の pKOFUT8Neo を 1.6×10^6 個の CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により導入した後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) [透析 FBS (インビトロジェン社製) を 10%、HT supplement (インビトロジェン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、接着細胞培養用 10cm デッシュ (Falcon 社製) へ播種した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養後、G418 (ナカライテスク社製) を $600\mu\text{g/mL}$ の濃度で含む IMDM-dFBS (10) [透析 FBS を 10% で含む IMDM 培地] 10mL に培地交換した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、15 日間の培養を行い、G418 耐性クローンを取得した。

(2) ゲノム PCR による相同組換えの診断

本項 (1) で取得した G418 耐性クローンの相同組換えの診断を、ゲノム DNA を用いた PCR により、以下のように行った。

96 穴プレート上の G418 耐性クローンに対してトリプシン処理を行った後、2 倍容量の凍結培地 [20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM] を各ウェルに添加、懸濁した。各ウェル中の細胞懸濁液の半量を接着細胞用平底 96 穴プレート (旭テクノグラス社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存した。

レプリカプレート上のネオマイシン耐性クローンは、G418 を $600\mu\text{g/mL}$ の濃度で含む IMDM-dFBS (10) で 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、1 週間培養した後、細胞を回収し、回収した細胞から公知の方法 [Analytical Biochemistry, 201, 331 (1992)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 $30\mu\text{L}$ の TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA、200 $\mu\text{g/mL}$ RNase A] に一晩溶解した。

ゲノム PCR に用いるプライマーは以下のように設計した。まず、W003/31140 の実施例 12 に記載の方法により取得した FUT8 ゲノム領域の配列 (配列番号 55) の中から、配列番号 56 ま

たは配列番号 57 でそれぞれ示されるプライマーをフォワードプライマーとした。また、ターゲティングベクターの loxP 配列に特異的に結合するプライマー（配列番号 58 または配列番号 59）をリバースプライマーとし、以下のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に用いた。上記で調製したゲノム DNA 溶液を各々 10 μ L 含む 25 μ L の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー（フォワードプライマーとリバースプライマーを組み合わせる）] を調製し、94°C にて 3 分間の加熱の後、94°C にて 1 分間、60°C にて 1 分間、72°C にて 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして PCR を行った。

PCR 後、該反応液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、相同組換えによって生じる約 1.7Kb の特異的増幅産物が認められた株を陽性クローンと判定した。

(3) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項 (2) で取得された陽性クローンの相同組換えの診断を、ゲノム DNA を用いたサザンプロットにより、以下のように行った。

本項 (2) で凍結保存したマスタープレートのうち、本項 (2) で見出された陽性クローンを含む 96 穴プレートを選択し、5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、10 分間静置した後、陽性クローンに該当するウェル中の細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート（グライナー社製）へ播種した。G418 を 600 μ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS(10) を用いて 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート（グライナー社製）へ播種した。該プレートを 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養し、細胞を回収した。回収した細胞より公知の方法 [Nucleic Acids Research, 3, 2303 (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 150 μ L の TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) に一晚溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12 μ g を制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) で消化し、エタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、20 μ L の TE 緩衝液 (pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA] に溶解し、0.6% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3683 (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80°C で 2 時間の熱処理を行い、固定化した。

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。W003/31140 の実施例 12

に記載の方法により取得した FUT8 ゲノム領域の配列（配列番号 55）の中から、配列番号 60 および配列番号 61 でそれぞれ示されるプライマーを作製し、以下の PCR に用いた。WO02/31140 の実施例 12 に記載の pFUT8fgE2-2 4ng をテンプレートとして含む 20 μ L の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー] を調製し、94°C にて 1 分間の加熱の後、94°C にて 30 秒間、55°C にて 30 秒間、74°C にて 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101 社製) を用いて約 230bp のプローブ DNA 断片を回収した。得られたプローブ DNA 溶液のうち 5 μ L を、[α -³²P] dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のゲノム DNA 消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、15mL のハイブリダイゼーション液 [5 \times SSPE、50 \times Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100 μ g/mL サケ精子 DNA] を加えて 65°C で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、³²P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 50mL の一次洗浄液 [2 \times SSC-0.1% (w/v) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、ナイロン膜を 50mL の二次洗浄液 [0.2 \times SSC-0.1% (w/v) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80°C で暴露し現像した。

第 2 図には、親株である CHO/DG44 細胞、および本項 (2) で取得した陽性クローンである 50-10-104 株のゲノム DNA を本法により解析した結果を示した。CHO/DG44 細胞では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片のみが検出された。一方、陽性クローン 50-10-104 株では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片に加え、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約 20Kb の断片が検出された。両断片の量比は 1 : 1 であったことから、50-10-104 株は、FUT8 対立遺伝子のうち 1 コピーが破壊されたヘミノックアウトクローンであることが確認された。

3. ゲノム上の FUT8 遺伝子をダブルノックアウトした CHO/DG44 細胞の作製

(1) ターゲティングベクター pKOFUT8Puro 導入株の作製

本実施例の第2項で得た FUT8 遺伝子ヘミノックアウトクローンのもう一方の FUT8 対立遺伝子を破壊するために、WO02/31140 の実施例 13 の第1項に記載のチャイニーズハムスター FUT8 遺伝子エクソン 2 ターゲティングベクターである pKOFUT8Puro を以下のようにして導入した。

pKOFUT8Puro を制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) で消化して線状化し、線状化した 4 μ g の pKOFUT8Puro を 1.6×10^6 個の FUT8 遺伝子ヘミノックアウトクローンへエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) に懸濁し、接着細胞培養用 10cm デッシュ (Falcon 社製) へ播種した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養後、ピューロマイシン (SIGMA 社製) を 15 μ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1) 10mL に培地交換した。この培地交換作業を 7 日毎に繰り返しながら 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、15 日間の培養を行い、ピューロマイシン耐性クローンを取得した。

(2) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項 (1) で取得された薬剤耐性クローンの相同組換えの診断を、ゲノム DNA を用いたサザンプロットにより以下のように行った。

ピューロマイシン耐性クローンを、公知の方法 [Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)] に従って接着細胞用平底プレート (旭テクノグラス社製) へ採取し、ピューロマイシン (SIGMA 社製) を 15 μ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1) を用いて 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、接着細胞用平底 24 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。ピューロマイシン (SIGMA 社製) を 15 μ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1) を用いて 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、1 週間培養した後、同様にトリプシン処理を行い、接着細胞用平底 6 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。該プレートを 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養し、回収した細胞より公知の方法 [Nucleic Acids Research, 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 150 μ L の TE-RNase 緩衝液 (pH8) に一晚溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12 μ g を制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) で消化し、

エタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、20 μ L の TE 緩衝液 (pH8.0) に溶解し、0.6% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写後、ナイロン膜に対し 80°C で 2 時間の熱処理を行い、固定化した。

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。

まず、ターゲティングベクターに含まれる FUT8 ゲノム領域よりもさらに 5' 側の配列に特異的に結合するプライマー (配列番号 62 および配列番号 63) を作製し、以下の PCR に用いた。WO02/31140 の実施例 12 に記載のプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng をテンプレートとして含む 20 μ L の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー] を調製し、94°C にて 1 分間の加熱の後、94°C にて 30 秒間、55°C にて 30 秒間、74°C にて 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。

PCR 後、該反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BI0101 社製) を用いて約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液のうち 5 μ L を、[α -³²P] dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のゲノム DNA 消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、15mL のハイブリダイゼーション液 [5 \times SSPE、50 \times Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100 μ g/mL サケ精子 DNA] を加えて 65°C で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、³²P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 50mL の一次洗浄液 [2 \times SSC-0.1% (w/v) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、ナイロン膜を 50mL の二次洗浄液 [0.2 \times SSC-0.1% (w/v) SDS] に浸漬し、65°C で 15 分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80°C で暴露し現像した。

第 3 図には、50-10-104 株から本項 (1) に記載の方法により取得したピューロマイシン耐性クローンの 1 つである WK704 株のゲノム DNA を本法により解析した結果を示した。WK704 株では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片が消失し、相同組換えされた対立遺伝

子に特異的な約 20Kb の断片（図中、矢印で示した）のみが検出された。この結果から WK704 株は、FUT8 両対立遺伝子が破壊されたクローンであることが確認された。

4. FUT8 遺伝子をダブルノックアウトした細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

(1) Cre リコンビナーゼ発現ベクターの導入

本実施例の第 3 項で取得した FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローンの薬剤耐性遺伝子を除去することを目的として、Cre リコンビナーゼ発現ベクター pBS185 (Life Technologies 社製) を以下のようにして導入した。

4 μ g の pBS185 を 1.6×10^6 個の FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローンへエレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]により導入後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) 10mL に懸濁し、さらに同培地を用いて 2 万倍に希釈した。該希釈液を接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 7 枚へ播種後、5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、10 日間の培養を行い、コロニーを形成させた。

(2) Cre リコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

本項(1)で取得したコロニーのうち、任意のクローンを公知の方法[Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)]に従って接着細胞用平底プレート（旭テクノガラス社製）へ採取し、IMDM-dFBS(10)-HT(1)を用いて 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対してトリプシン処理を行い、2 倍容量の凍結培地 [20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM] を各ウェルに添加、懸濁した。各ウェル中の細胞懸濁液の半量を接着細胞用平底 96 穴プレート（旭テクノガラス社製）へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存した。

次にレプリカプレート上の細胞を、G418 を 600 μ g/mL、ピューロマイシンを 15 μ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、一週間培養した。Cre リコンビナーゼの発現により loxP 配列に挟まれた薬剤耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、G418 およびピューロマイシン存在下で死滅する。本法により陽性クローンを選択した。

(3) ゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断

本項 (2) で選択した陽性クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断を行った。

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、上記陽性クローンを含む96穴プレートを選択し、5%CO₂インキュベーター内で37°C、10分間静置した。静置後、上記クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底24穴プレート(グライナー社製)へ播種した。

IMDM-dFBS(10)-HT(1)を用いて1週間培養した後、トリプシン処理を行い、接着細胞用平底6穴プレート(グライナー社製)へ播種して5%CO₂インキュベーター内で37°Cで培養し、増殖した細胞を回収した。回収した細胞より公知の方法[Nucleic Acids Research, 3, 2303(1976)]に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々150μLのTE-RNase緩衝液(pH8)に一晩溶解した。

上記で調製したゲノムDNA 12μgを制限酵素NheI(New England Biolabs社製)で消化し、エタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、20μLのTE緩衝液(pH8.0)に溶解し、0.6%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3683(1979)]に従って、ナイロン膜へゲノムDNAを転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し80°Cで2時間の熱処理を行い、固定化した。

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。ターゲティングベクターに含まれるFUT8ゲノム領域よりもさらに5'側の配列に特異的に結合するプライマー(配列番号62および配列番号63)を用いて、以下のPCRを行った。WO02/31140の実施例12に記載のpFUT8fgE2-2 4ngをテンプレートとして含む20μLの反応液[DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)、ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5μmol/L上記プライマー]を調製し、94°Cにて1分間の加熱の後、94°Cにて30秒間、55°Cにて30秒間、74°Cにて1分間からなる反応を1サイクルとした25サイクルの条件でPCRを行った。

PCR後、該反応液を1.75%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit(BIO101社製)を用いて、約230bpのプローブDNA断片を精製した。得られたプローブDNA溶液のうち5μLを、[α-³²P] dCTP 1.75MBqおよびMegaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のゲノムDNA消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液[5×SSPE、50×Denhardt's液、0.5%(w/v) SDS、100μg/mL サケ精子DNA] 15mLを加えて65°Cで3時間のプレハイブリダイゼーション後、³²P標識したプローブDNAを熱変性してボトルへ投入し、

65°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 50mL の一次洗浄液 [$2\times\text{SSC}-0.1\%(\text{W/V})$ SDS] に浸漬し、65°Cで 15 分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、ナイロン膜を 50mL の二次洗浄液 [$0.2\times\text{SSC}-0.1\%(\text{W/V})$ SDS] に浸漬し、65°Cで 15 分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80°C で暴露し現像した。

第 4 図には、親株である CHO/DG44 細胞、本実施例の第 2 項に記載の 50-10-104 株、本実施例の第 3 項に記載の WK704 株、および WK704 株から本項 (2) に記載の方法により取得した薬剤感受性クローンの 1 つである 4-5-C3 株のゲノム DNA を、本法により解析した結果を示した。CHO/DG44 細胞では、野生型 FUT8 対立遺伝子に由来する約 8.0Kb の DNA 断片のみが検出された。また、50-10-104 株や WK704 株では、相同組換えが起こった対立遺伝子に由来する約 9.5Kb の DNA 断片が認められた。一方、4-5-C3 株では、相同組換えが起こった対立遺伝子からさらにネオマイシン耐性遺伝子 (約 1.6Kb) およびピューロマイシン耐性遺伝子 (約 1.5Kb) が除去されて生じる約 8Kb の DNA 断片のみが検出された。この結果から 4-5-C3 株は、Cre リコンビナーゼにより薬剤耐性遺伝子が除去されたことが確認された。

薬剤耐性遺伝子の除去された FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン (以下、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞と表記する) は、4-5-C3 株以外にも複数株取得された。

実施例 2

FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞による抗 TAG-72 scFv-Fc の発現

1. 抗 TAG-72 scFv-Fc 発現ベクターの作製

(1) 抗 TAG-72 マウスモノクローナル抗体の VH をコードする DNA の構築

癌細胞表面抗原 TAG-72 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 CC49 [The Journal of Immunology, 151, 6559 (1993)、Genbank Accession number/L14549] の VH をコードする DNA を以下のようにして構築した。

まず、配列番号 18 に示される塩基配列を設計した。該配列は、CC49 の VH をコードする配列を、クローニングベクターおよび発現ベクターにクローニングするための制限酵素認識配列、コード領域の 5' 側には scFv-Fc の生産量を向上させるために 11 塩基の非翻訳配列および 3' 側にはリンカーをコードする塩基配列を組み入れた。設計した配列番号 18 に示される塩基

配列はセンス鎖とアンチセンス鎖が交互になるように、5'端側から約 130 塩基ずつ計 4 本の塩基配列に分割し、隣り合う塩基配列はその末端の約 20 塩基が重複し、対合できるようにし、配列番号 19、20、21 および 22 でそれぞれ示される 4 本の合成 DNA (ファスマック社製) を作製した。

4 本の合成 DNA のうち両端に位置する 2 本については終濃度が $0.5\mu\text{M}$ 、中間の 2 本については終濃度が $0.1\mu\text{M}$ となるように、PCR 反応液[2.5units KOD DNA Polymerase (東洋紡績社製)、1 倍濃度の KOD DNA Polymerase に添付 PCR Buffer #2 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウム]を調製し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製) を用いて、 94°C にて 5 分間加熱した後、 94°C にて 30 秒間、 55°C にて 30 秒間、 74°C にて 60 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行なった後、 74°C にて 5 分間反応させた。PCR 後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 450bp の PCR 産物を回収した。回収した PCR 産物を制限酵素 SpeI (宝酒造社製) および制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 450bp の PCR 断片を回収した。

一方、プラスミド pBluescriptII SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および SpeI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.9kbp の断片を回収した。

上記で得られた約 450bp の PCR 断片とプラスミド pBluescriptII SK(-)由来の約 2.9kbp の断片を、Ligation High 溶液 (東洋紡績社製) により連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 XL1-BLUE MRF' 株 (Stratagene 社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサー ABI PRISM 377 により各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析し、第 5 図に示したプラスミド pBSIISK(-)/CC49VH が得られたことを確認した。

(2) 抗 TAG-72 マウスモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードする DNA の構築

癌細胞表面抗原 TAG-72 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 CC49[The Journal of Immunology, 151, 6559 (1993)、Genbank Accession number/L14553] の VL をコードする DNA

を以下のようにして構築した。

まず、配列番号 23 に示される塩基配列を設計した。該配列には、CC49 の VL をコードする配列を、クローニングベクターおよび発現ベクターにクローニングするための制限酵素認識配列、コード領域の 3' 側にヒンジ領域の塩基配列およびヒト IgG1 の CH2 領域の塩基配列、5' 側には VH とのリンカーをコードする塩基配列を組み入れた。設計した配列番号 23 に示される塩基配列はセンス鎖とアンチセンス鎖が交互になるように、5' 端側から約 150 塩基ずつ計 4 本の塩基配列に分割し、隣り合う塩基配列はその末端の約 20 塩基が重複し、対合できるようにし、配列番号 24、25、26 および 27 でそれぞれ示される 4 本の合成 DNA (ファスマック社製) を作製した。

4 本の合成 DNA のうち両端に位置する 2 本については終濃度が 0.5 μ M、中間の 2 本については終濃度が 0.1 μ M となるように、PCR 反応液[2.5units KOD DNA Polymerase (東洋紡績社製)、KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #2 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウム]を調製し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製) を用いて、94°C にて 5 分間加熱した後、94°C にて 30 秒間、55°C にて 30 秒間、74°C にて 60 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行なった後、74°C にて 5 分間反応させた。PCR 後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 540bp の VL の PCR 産物を回収した。回収した PCR 産物を制限酵素 SpeI (宝酒造社製) および制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 450bp の PCR 産物由来の断片を回収した。

一方、プラスミド pBluescriptII SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および SpeI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 2.9kbp の断片を回収した。

上記で得た約 450bp の PCR 断片とプラスミド pBluescriptII SK (-) 由来の約 2.9kbp の断片を、Ligation High 溶液 (東洋紡績社製) により連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 XL1-BLUE MRF' 株 (Stratagene 社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ

—ABI PRISM 377 により各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析し、第 6 図に示したプラスミド pBSIISK(-)/CC49VL が得られたことを確認した。

(3) 抗 TAG-72 scFv-Fc 発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 [Mol. Immunol., 37, 1035 (2000)]、本項 (1) および上記 (2) で得られたプラスミド pBSIISK(-)/CC49VH および pBSIISK(-)/CC49VL から、抗 TAG-72 scFv-Fc 融合蛋白質の発現ベクターを以下のようにして構築した。

上記 (1) で得られたプラスミド pBSIISK(-)/CC49VH を制限酵素 AccIII (宝酒造社製) および制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 450bp の EcoRI-AccIII 断片を回収した。

また、本項 (2) で得られたプラスミド pBSIISK(-)/CC49VL を制限酵素 AccIII (宝酒造社製) および制限酵素 BmgBI (New England Biolabs 社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 540bp の AccIII-BmgBI 断片を回収した。

一方、ヒト化抗体発現用ベクタープラスミド pKANTEX93 を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 BmgBI (New England Biolabs 社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 9.8kbp の EcoRI-BmgBI 断片を回収した。

上記で得られたプラスミド pBSIISK(-)/CC49VH 由来の EcoRI-AccIII 断片、プラスミド pBSIISK(-)/CC49VL 由来の AccIII-BmgBI 断片およびプラスミド pKANTEX93 由来の断片を、Ligation High 溶液 (東洋紡績社製) により連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 XL1-BLUE MRF' 株 (Stratagene 社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサー ABI PRISM 377 により各プラスミドに挿入された塩基配列を解析し、第 7 図に示したプラスミド pKANTEX93/CC49scFv-Fc が得られたことを確認した。

2. FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞での安定発現

実施例 1 の第 4 項に記載の FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞である Ms705 細胞および親

株である CHO/DG44 細胞を宿主細胞として用いて、本実施例の第 1 項で作製した抗 TAG-72 scFv-Fc 発現ベクター-pKANTEX93/CC49scFv-Fc を導入して、抗体 Fc に付加する糖鎖の構造が異なる二種類の抗 TAG-72 scFv-Fc 融合蛋白質の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

8 μ g のプラスミド pKANTEX93/CC49scFv-Fc を 1.6×10^8 細胞の Ms705 細胞あるいは CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]により導入後、30mL の IMDM-(10) [Ms705 細胞の場合には牛胎児血清(FCS)を、CHO/DG44 細胞の場合には透析牛血清(dFBS)を 10%で含む IMDM 培地: GIBCO-BRL 社製]培地に懸濁し、96 ウェルマイクロプレート(住友ベークライト社製)に 100 μ L/ウェルずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、600 μ g/mL の濃度で G418 を含む IMDM-(10) 培地において 1~2 週間培養した。培養後、各ウェルから培養上清を回収し、培養上清中の抗 TAG-72 scFv-Fc 融合蛋白質の産生量を後述する本実施例の第 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に scFv-Fc の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418 を 600 μ g/mL、dhfr 遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素の阻害剤であるメソトレキセート(以下、MTX と表記する: SIGMA 社製)を 50nM の濃度で含む IMDM-(10)培地に懸濁し、5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、約 1 週間培養し、50nM の MTX に耐性を示す形質転換株を取得した。次に、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に 600 μ g/mL の G418 および 200nM の MTX を含む IMDM-(10)培地で増殖可能な形質転換株を取得した。取得した形質転換株について、限界希釈法による単一細胞化(クローン化)を行った。

最終的に 500 μ g/mL の G418 および 200nM の MTX を含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 TAG-72 scFv-Fc 融合蛋白質を生産する形質転換株を取得した。親株の CHO/DG44 細胞より得られた形質転換株を KC1201 と、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞より得られた形質転換株を KC1200 と名付けた。

3. 培養上清中の抗 TAG-72 scFv-Fc 融合蛋白質濃度の測定 (ELISA 法)

ヤギ抗ヒト IgG(H&L)抗体(American Qualex 社製)を Phosphate Buffered Saline (以下、PBS と表記する)で希釈して 1 μ g/mL とし、96 穴の ELISA 用プレート(グライナー社製)に、50 μ L/ウェルで分注し、室温で一時間静置して吸着させた。反応後、PBS で洗浄し、1%牛血清アルブミン(以下、BSA と表記する; Proliant Inc.社製)を含む PBS (以下、1%BSA-PBS と表記

する)を100 μ L/ウェルに加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1% BSA-PBS を除去し、測定対象の培養上清を50 μ L/ウェルに加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween20を含むPBS(以下、Tween-PBSと表記する)で洗浄後、PBSで500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(Fc)抗体溶液(American Qualex社製)を二次抗体溶液として、それぞれ50 μ L/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。Tween-PBSで洗浄後、ABTS 基質液[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムの0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 μ L/mLで添加した溶液]を50 μ L/ウェルに加えて発色させ、415nmの吸光度(以下、OD415と表記する)を測定した。

4. 抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の精製

本実施例の第2項で得られた抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質を発現する形質転換株KC1200およびKC1201をそれぞれ200nM MTXを含むIMDM-FCS(10)に 1×10^5 細胞/mLとなるように懸濁し、182cm²フラスコ(Greiner社製)に50mL分注した。5%CO₂インキュベーター内で37°C、7日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を除去し、25mLのPBSで洗浄後、EXCELL301培地(JRH Biosciences社製)30mLを注入した。5%CO₂インキュベーター内で37°C、7日間培養した後、細胞懸濁液を回収し、3000rpm、4°Cの条件で5分間の遠心分離を行って上清をそれぞれ回収した後、0.22 μ m孔径PES Membrane(イワキ社製)を用いて濾過滅菌した。上述の方法で回収した培養上清よりProsep-A(ミリポア社製)カラムを用いて、添付の説明書に従い、異なる形質転換株で生産される二種類の抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質をそれぞれ精製した。以後、精製した抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質は、それぞれKC1200により生産される抗TAG-72 scFv-Fc(-)およびKC1201により生産される抗TAG-72 scFv-Fc(+)と表記する。

5. 精製抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の分析

本実施例の第4項で精製した抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の精製度および抗体に付加している全N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を以下のようにして確認した。

(1) 抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の精製度の評価

各精製抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の約3 μ gを、公知の方法[Nature, 227, 680 (1970)]に従ってSDS変性ポリアクリルアミド電気泳動(以下、SDS-PAGEと表記する)を行った。

結果を第8図に示した。二種類の精製蛋白質はそれぞれ、非還元条件下は約 110 キロダルトン（以下、kDa と表記する）、還元条件下では約 55kDa のバンドとして検出された。この結果は、scFv-Fc 融合蛋白質の分子量が、非還元条件下では約 110kDa であり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合（以下、S-S 結合と表記する）が切断され、約 55kDa の構成単位に分解されるという報告 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 36, 61 (1999)] と一致し、宿主の異なる抗 TAG-72 scFv-Fc(-)および抗 TAG-72 scFv-Fc(+)では泳動パターンが類似している。このことから、抗 TAG-72 scFv-Fc(-)および抗 TAG-72 scFv-Fc(+)は目的に合致したポリペプチド鎖として発現されていることが示唆された。

(2) 精製抗 TAG-72 scFv-Fc 融合蛋白質の単糖組成分析

本実施例の第4項で得られた抗 TAG-72 scFv-Fc(-)および抗 TAG-72 scFv-Fc(+)の精製標品を遠心濃縮機で減圧下乾固した後、2.0-4.0M のトリフルオロ酢酸溶液を加えて 100°C、2~4 時間酸加水分解を行い、タンパク質から中性糖・アミノ糖を遊離した。トリフルオロ酢酸溶液を遠心濃縮機で除去し、脱イオン水に再溶解して Dionex 社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析を行った。CarboPac PA-1 カラム、CarboPac PA-1 ガードカラム (Dionex 社製)を用い、溶離液として 10-20mM 水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液、洗浄液として 500mM 水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液を使用して、第1表に示した溶出プログラムで分析した。

(第1表)

中性糖・アミノ糖組成分析の溶出プログラム

時間 (分)	0	35	35.1	45	45.1	58
溶離液 (%)	100	100	0	0	100	100
洗浄液 (%)	0	0	100	100	0	0

得られた溶出プロファイルの中性糖・アミノ糖成分のピーク面積から、N-アセチルグルコサミン比を 4 とした場合の各成分（フコース、ガラクトース、マンノース）の組成比を算出した。

第2表に各蛋白質の単糖組成比により計算される、全 N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を示した。抗 TAG-72 scFv-Fc(+)ではフコースが結合していない糖鎖の割合が 9%であった。一方、抗 TAG-72 scFv-Fc(-)ではフコースのピークは検出限界以下であったことから、フコースが結合していない糖鎖の割合はほぼ 100%と見積もられた。

以上の結果より、抗 TAG-72 scFv-Fc 融合蛋白質の N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していないことが示された。

(第2表)

抗 TAG-72 scFv-Fc 融合蛋白質のフコース非含有糖鎖の割合

蛋白質名	フコースを含まない糖鎖率 (%)
抗 TAG-72 scFv-Fc(+)	9%
抗 TAG-72 scFv-Fc(-)	~100%

実施例 3

抗 TAG-72 scFv-Fc 融合蛋白質の活性評価

1. 抗 TAG-72 scFv-Fc 融合蛋白質の TAG-72 発現細胞に対する結合活性 (蛍光抗体法)

実施例 2 の第 4 項で得られた抗 TAG-72 scFv-Fc(-)および抗 TAG-72 scFv-Fc(+)の精製標品の結合活性を、フローサイトメーター EPICS-XL (Coulter 社製) を用いた蛍光抗体法によって評価した。陰性対照として抗 IL-5 受容体ヒト化抗体 KM8404 [The Journal of Biological Chemistry, 31, 3466 (2003)] を用いた。

TAG-72 陽性細胞であるヒト T 細胞リンパ腫由来細胞株 Jurkat 細胞(RCB 0806)を 1 ウェル当たり 2×10^5 個になるように 96 ウェル U 字プレート (Falcon 社製) に分注し、抗 TAG-72 scFv-Fc(-)、抗 TAG-72 scFv-Fc(+)または陰性対照である抗 IL-5 受容体ヒト化抗体 KM8404 を FACS 用緩衝液 (0.02% EDTA、0.05% NaN_3 および 0.5% BSA を含む PBS) で終濃度が 0.016~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように希釈した抗体溶液を 50 μL /ウェルで添加して、水中で 30 分間反応させた。FACS 用緩衝液で 2 回洗浄した後、FITC 標識抗ヒト IgG1 抗体 (Zymed 社製) を FACS 用緩衝液で 20 倍希釈して 50 μL /ウェルで添加した。遮光下水中で 30 分間反応させた後、FACS

用緩衝液で3回洗浄し、500 μ LのPBSに懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。

結果を第9図に示した。抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)については濃度依存的に蛍光強度が増加しており、各濃度でのJurkat細胞への結合活性は同等であったが、陰性対照である抗IL-5受容体ヒト化抗体KM8404はJurkat細胞には結合しなかった。以上のことから、抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)のTAG-72陽性細胞であるJurkat細胞への結合は、融合蛋白質のscFv部分に特異的な結合であり、この結合は抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質に付加する糖鎖中のフコース含量とは無関係であることが示された。

2. 抗TAG-72 scFv-FcのTAG-72結合活性(ELISA法)

ヒト体液由来のTAG-72(シグマ社製)をPBSで1 μ g/mLに希釈し、96穴のELISA用プレート(グライナー社製)に、50 μ L/ウェルで分注して室温で一時間静置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100 μ L/ウェルに加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを除去し、0.0032 μ g/mL~50 μ g/mLの濃度で抗TAG-72 scFv-Fc(-)、抗TAG-72 scFv-Fc(+)または陰性対照である抗IL-5受容体ヒト化抗体KM8404を50 μ L/ウェルに加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄し、PBSで500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(Fc)抗体溶液(American Qualex社製)を二次抗体溶液として、それぞれ50 μ L/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液を50 μ L/ウェルに加えて発色させ、OD415を測定した。

結果を第10図に示した。抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)は濃度依存的に抗原であるTAG-72に結合することが確認され、その結合はほぼ同等であった。一方、陰性対照である抗IL-5受容体ヒト化抗体KM8404では、TAG-72に対する結合は認められなかった。以上のことから、作製した糖鎖構造の異なる二種類の抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の抗原であるTAG-72への結合は、scFv部分に特異的な結合であった。二種類の抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の抗原への結合活性はほぼ同等であったが、抗TAG-72 scFv-Fc(-)の抗原であるTAG-72に対する結合活性は、抗TAG-72 scFv-Fc(+)のTAG-72に対する結合活性と比較して、若干であるが高いことが確認された。

3. 抗TAG-72 scFv-FcのFc γ 受容体IIIa結合活性(ELISA法)

Fc γ 受容体IIIaには、N末端のメチオニンから数えて176番目のアミノ酸残基の遺伝子多

形によりバリニン型（以下、Fc γ RIIIa(V)と表記する）およびフェニルアラニン型（以下、Fc γ RIIIa(F)と表記する）の二種が存在し、両者は抗体Fcに対する結合活性が異なることが知られている。Fc γ RIIIa(V) および Fc γ RIIIa(F)に対する抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)の結合活性を測定した。測定に使用したヒスチジントグ標識Fc γ RIIIa(V)およびヒスチジントグ標識Fc γ RIIIa(F)は、後述する参考例に作製法を示した。

まず、マウス抗ヒスチジントグ抗体(QIAGEN社製)を吸着させたプレートに、PBSで1 μ g/mLに希釈したヒスチジントグ標識Fc γ RIIIa(V)またはヒスチジントグ標識Fc γ RIIIa(F)を50 μ L/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄し、0.0017 μ g/mL~100 μ g/mLの濃度で抗TAG-72 scFv-Fc(-)あるいは抗TAG-72 scFv-Fc(+)を50 μ L/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄し、PBSで6000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIg(H&L)抗体溶液(American Qualex社製)を二次抗体溶液として、それぞれ50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄し、ABTS基質液を50 μ L/ウェルで加えて発色させ、OD415を測定した。

結果を第11図に示した。抗TAG-72 scFv-Fc(-)および抗TAG-72 scFv-Fc(+)は濃度依存的にFc γ RIIIaに結合することが確認でき、Fc γ RIIIaに対する抗TAG-72 scFv-Fc(-)の結合活性は、抗TAG-72 scFv-Fc(+)の結合活性と比較して有意に高いことが示された。この結果は、二種類のFc γ RIIIaの多形において同様であった。また、scFv-Fc(-)およびscFv-Fc(+)とFc γ RIIIaとの間に結合が確認されたことより、scFv-FcのFc領域は、Fc γ RIIIaと結合活性を保持した形で発現していることが示された。

4. 抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質の抗原であるTAG-72存在下でのFc γ 受容体IIIIa結合活性(ELISA法)

抗原であるTAG-72の存在下で抗TAG-72 scFv-Fc融合蛋白質のFc γ RIIIa(V)およびFc γ RIIIa(F)との結合活性を測定した。測定に使用したヒスチジントグ標識Fc γ RIIIa(V)およびヒスチジントグ標識Fc γ RIIIa(F)は、後述する参考例に作製法を示した。

まず、本実施例の第2項で作製したプレートに、0.0017 μ g/mL~100 μ g/mLの濃度で抗TAG-72 scFv-Fc(-)または抗TAG-72 scFv-Fc(+)を50 μ L/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄し、PBSで1 μ g/mLに希釈したヒスチジントグ

標識 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa(V)}$ またはヒスチジンタグ標識 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa(F)}$ を $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄し、PBS で 1000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒスチジンタグ抗体溶液 (QIAGEN 社製) を二次抗体溶液として、それぞれ $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を $50\mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、OD415 を測定した。

結果を第 12 図に示した。抗 TAG-72 scFv-Fc(-) は濃度依存的に $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ および抗原である TAG-72 に対して結合活性が認められたが、抗 TAG-72 scFv-Fc(+) では発色が認められなかった。これは、本実施例の第 2 項で確認された、抗 TAG-72 scFv-Fc(-) と抗 TAG-72 scFv-Fc(+) との間で認められた TAG-72 に対する結合活性の差以上に大きく、このことは、抗 TAG-72 scFv-Fc(-) または抗 TAG-72 scFv-Fc(+) が抗原 TAG-72 と結合している場合の抗 TAG-72 scFv-Fc(-) または抗 TAG-72 scFv-Fc(+) の $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ に対する結合活性は、抗 TAG-72 scFv-Fc(-) の方が抗 TAG-72 scFv-Fc(+) よりも高いことを示している。また、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ の多形とは関係なしに、抗原である TAG-72 の存在下での $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ に対する抗 TAG-72 scFv-Fc(-) の結合活性は、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ に対する抗 TAG-72 scFv-Fc(+) の結合活性よりも高いことが確認され、バリン型の $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa(V)}$ においては TAG-72 scFv-Fc(-) と抗 TAG-72 scFv-Fc(+) の $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ に対する結合活性の差が顕著であった。

5. TAG-72 発現細胞株に対する細胞傷害活性の評価 (ADCC 活性、 ^{51}Cr 解離法)

実施例 2 の第 4 項で得られた精製抗 TAG-72 scFv-Fc(-) および精製抗 TAG-72 scFv-Fc(+) の *in vitro* 細胞傷害活性を評価するため、TAG-72 陽性であるヒト T 細胞リンパ腫由来細胞株 Jurkat 細胞に対する ADCC 活性を、健常人ドナーから採取したエフェクター細胞を用いて、 ^{51}Cr 解離法による ADCC 活性を以下のようにして測定した。また、陰性対照の細胞株として、TAG-72 が発現していない細胞株である Raji 細胞 (RCB 0806) を用いた。

(1) 標的細胞懸濁液の調製

Jurkat 細胞あるいは Raji 細胞を 2×10^6 細胞/mL の濃度になるように RPMI1640-FCS(10) 培地 [FCS を 10% 含む RPMI1640 培地 (GIBCO BRL 社製)] に懸濁し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を 3.7MBq 当量加えて 37°C で 1 時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FCS(10) 培地を用いて懸濁及び遠心分離操作を繰り返すことにより 3 回洗浄し、再度 RPMI1640-FCS(10) 培地に懸濁し、 4°C で 30 分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。洗浄後、

RPMI1640-FCS(10)培地を 10mL 加えて 2×10^5 細胞/mL に調整し、標的細胞懸濁液とした。

(2) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

健康人末梢血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0.2mL を加え穏やかに混合した。これを Lymphoprep（第一化学薬品社製）を用いて使用説明書に従って単核球層を分離した。RPMI1640 培地で 1 回、RPMI1640-FCS(10)培地で 1 回遠心分離して洗浄後、RPMI1640-FCS(10)培地を加えて 2×10^6 細胞/mL に調整し、ヒトエフェクター細胞懸濁液とした。

(3) ADCC 活性の測定

96 ウェル U 字底プレート（Falcon 社製）の各ウェルに上記（1）で調製した標的細胞溶液の 50 μ L (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで上記（2）で調製したヒトエフェクター細胞溶液を 100 μ L (2×10^5 細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は 20:1 となる) 添加した。更に、抗 TAG-72 scFv-Fc(-)または抗 TAG-72 scFv-Fc(+)を各最終濃度 0.000094 ~ 50 μ g/mL となるように加えて全量を 200 μ L とし、37°C で 4 時間反応させた。反応後、遠心分離により該反応溶液を細胞群と上清とに分離し、上清中の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。同時に、は、エフェクター細胞溶液および抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、また、エフェクター細胞自然遊離の ^{51}Cr 量は、標的細胞溶液および抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、上記と同様の操作を行うことで取得した。また、標的細胞全遊離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液とヒトエフェクター細胞溶液の代わりに 1N の塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC 活性は次式により求めた。

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = \{(\text{各サンプル濃度での } ^{51}\text{Cr 量} - \text{エフェクター細胞自然遊離の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{標的細胞自然遊離の } ^{51}\text{Cr 量}) / (\text{標的細胞全遊離の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{標的細胞自然遊離の } ^{51}\text{Cr 量})\} \times 100$$

結果を第 13 図に示した。図の A に示されるように、抗 TAG-72 scFv-Fc(-)または抗 TAG-72 scFv-Fc(+)において、TAG-72 陽性細胞である Jurkat 細胞に対して濃度依存的な ADCC 活性が認められた。いずれの抗体濃度においても、抗 TAG-72 scFv-Fc(-)による ADCC 活性は抗 TAG-72 scFv-Fc(+)による ADCC 活性よりも高く、また、最大細胞傷害活性も抗 TAG-72 scFv-Fc(+)と比べて抗 TAG-72 scFv-Fc(-)の方が高く、抗 TAG-72 scFv-Fc(+)が抗 TAG-72 scFv-Fc(-)と同等の ADCC 活性を示すためには、1000 倍の濃度が必要であり、本実施例の第 2 項で確認された

抗 TAG-72 scFv-Fc(+)および抗 TAG-72 scFv-Fc(-)の抗原である TAG-72 に対する結合活性の差以上の違いがあった。一方、図の B に示されるように、TAG-72 陰性である Raji 細胞に対しては、scFv-Fc(-)および scFv-Fc(+)はともに ADCC 活性は認められなかった。

以上のことから、抗 TAG-72 scFv-Fc(-)と抗 TAG-72 scFv-Fc(+)の間には、各 Fc 融合蛋白質組成物中の全 Fc 融合蛋白質に占める、Fc 融合蛋白質に結合した N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない Fc 融合蛋白質の割合には差があった。この割合の差が抗 TAG-72 scFv-Fc(-)と抗 TAG-72 scFv-Fc(+)との間の Fc γ RIIIa に対する結合活性の差であり、この Fc γ RIIIa に対する結合活性の差が ADCC 活性の差となっていることが確認できた。

実施例 4

FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞による抗 MUC1 scFv-Fc の発現

1. 抗 MUC1 scFv-Fc 発現ベクターの作製

(1) scFv-Fc 汎用発現ベクター pNUTS の構築

実施例 2 の第 1 項で作製した pKANTEX93/CC49scFv-Fc をもとに、scFv-Fc もしくは scFv₂-Fc をコードする塩基配列を挿入するためのベクターを以下のようにして構築した。

まず、実施例 2 の第 1 項で作製した pKANTEX93/CC49scFv-Fc を、制限酵素 BamH I (宝酒造社製) および Spe I (宝酒造社製) を用いて切断した後、Mung Bean Nuclease (宝酒造社製) を用いて末端の平滑化反応を行った。反応後、該反応液に Ligation High 溶液 (東洋紡績社製) を加えて連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 XL1-BLUE MRF' 株 (Stratagene 社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサー ABI PRISM 377 により各プラスミドの塩基配列を解析し、第 14 図に示されるプラスミド pKANTEX93/CC49scFv-Fc(B-S-)が得られたことを確認した。

次に、配列番号 77 に示される塩基配列を以下の手順で設計した。該配列には、該配列をプラスミドに組み入れるための制限酵素認識配列 (5' 末端側が EcoRI、3' 末端側が AccIII)、Signal 配列をコードする塩基配列 (制限酵素 AgeI 認識配列を含む)、および該配列中に最大

2 対の VH および VL を組み入れるための制限酵素認識配列 (5' 末端側より BamHI、SpeI を含む) をそれぞれ含む配列番号 78 および 79 でそれぞれ示される合成 DNA (ファスマック社製) を作製した後、定法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に従って 2 本の合成 DNA のアニーリング反応を行い、得られた DNA カセットをアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 80bp の DNA 断片を回収した。

一方、上記のプラスミド pKANTEX93/CC49scFv-Fc(B-S-) を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 10.5kbp の断片を回収した。

上記で得られた約 80bp の DNA 断片とプラスミド pKANTEX93/CC49scFv-Fc(B-S-) 由来の断片とを、Ligation High 溶液 (東洋紡績社製) を用いて連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 XL1-BLUE MRF' 株 (Stratagene 社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサー ABI PRISM 377 により各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析し、第 14 図に示したプラスミド pNUTS が得られたことを確認した。

(2) 抗 MUC1 マウスモノクローナル抗体の VH をコードする DNA の pNUTS ベクターへの挿入
癌細胞表面抗原 MUC1 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 C595 [British Journal of Cancer 76, 614 (1997)] の VH をコードする DNA を以下のようにして pNUTS ベクターに挿入した。

配列番号 80 に示される塩基配列を以下の手順で設計した。まず、データベース (Genbank Accession number/S77034) の抗 MUC1 マウスモノクローナル抗体 C595 の VH の塩基配列は、British Journal of Cancer, 76, 614 (1997) に記載の抗 MUC1 マウスモノクローナル抗体 C595 の VH のアミノ酸配列のうち、N 末端および C 末端の一部に相当する塩基配列が欠失していたため、同一のアミノ酸配列を持つ抗体クローンの塩基配列を参照し、補完した。また、同文献中に記載の、抗 MUC1 マウスモノクローナル抗体 C595 の VH の数アミノ酸残基を改変し、scFv に適した VH のアミノ酸配列をコードするように塩基配列を一部改変した。このようにして得られた VH の塩基配列の 5' 側に、発現ベクターにクローニングするための制限酵素 AgeI 認識

配列および Signal 配列を、3'側にはリンカーをコードする塩基配列および制限酵素 BamHI 認識配列を付加した。設計した配列を、センス鎖とアンチセンス鎖が交互になるように、5'端側から約 120 塩基ずつ計 4 本の塩基配列に分割し、隣り合う塩基配列はその末端の約 20 塩基が重複し、対合できるようにし、配列番号 81、82、83 および 84 でそれぞれ示される 4 本の合成 DNA (ファスマック社製) を作製した。

4 本の合成 DNA のうち両端に位置する 2 本については終濃度が 0.5 μ M、中間の 2 本については終濃度が 0.1 μ M となるように、PCR 反応液[2.5units KOD plus DNA Polymerase (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウム、DNA Polymerase 添付の 10 倍濃度 PCR Buffer (東洋紡績社製) を 10 分の 1 体積分含む]を調製し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製) を用いて、94°C にて 4 分間加熱した後、94°C にて 30 秒間、55°C にて 30 秒間、68°C にて 60 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行なった。PCR 後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 400bp の PCR 産物を回収した。回収した PCR 産物を制限酵素 AgeI (Nippon Gene 社製) および制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 400bp の PCR 断片を回収した。

一方、本項 (1) で作製したプラスミド pNUTS を制限酵素 AgeI (Nippon Gene 社製) および制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 10.5kbp の断片を回収した。

上記で得られた約 400bp の PCR 断片とプラスミド pNUTS 由来の断片とを、Ligation High 溶液 (東洋紡績社製) を用いて連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 XL1-BLUE MRF' 株 (Stratagene 社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサー ABI PRISM 377 により各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析し、第 15 図の A に示したプラスミド pNUTS/HM が得られたことを確認した。

(3) 抗 MUC1scFv-Fc 発現ベクターの構築

上記(2)で作製した pNUTS/HM に抗 MUC1 マウスモノクローナル抗体の VL をコードする DNA を組み入れ、抗 MUC1scFv-Fc 融合蛋白質の発現ベクターを以下のように構築した。

配列番号 85 に示される塩基配列を以下の手順で設計した。まず、データベースの抗 MUC1 マウスモノクローナル抗体 C595 の VL の塩基配列 (Genbank Accession number/S77032) は、文献中 [British Journal of Cancer, 76, 614 (1997)] に記載の抗 MUC1 マウスモノクローナル抗体 C595VL のアミノ酸配列のうち、N 末端および C 末端の一部に相当する塩基配列が欠失していたため、同一のアミノ酸配列を持つ抗体クローンの塩基配列を参照し、補完した。また、同文献中に記載の抗 MUC1 マウスモノクローナル抗体 C595 の VL の数アミノ酸残基を改変し、scFv に適した VL のアミノ酸配列をコードするように塩基配列を一部改変した。このような抗 MUC1 マウスモノクローナル抗体 C595 の VL をコードする塩基配列の 5' 側に、発現ベクターにクローニングするための制限酵素 BamHI 認識配列およびリンカーをコードする塩基配列を、3' 側にはヒンジをコードする塩基配列および制限酵素 PmaCI 認識配列を付加した。設計した配列番号 85 に示される塩基配列を、センス鎖とアンチセンス鎖が交互になるように、5' 端側から約 110 塩基ずつ計 4 本の塩基配列に分割し、隣り合う塩基配列はその末端の約 20 塩基が重複し、対合できるようにし、配列番号 86、87、88 および 89 でそれぞれ示される 4 本の合成 DNA (ファスマック社製) を作製した。

4 本の合成 DNA のうち両端に位置する 2 本については終濃度が 0.5 μ M、中間の 2 本については終濃度が 0.1 μ M となるように、PCR 反応液 [2.5units KOD plus DNA Polymerase (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウム、DNA Polymerase 添付の 10 倍濃度 PCR Buffer (東洋紡績社製) を 10 分の 1 体積分含む] を調製し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製) を用いて、94°C にて 4 分間加熱した後、94°C にて 30 秒間、55°C にて 30 秒間、68°C にて 60 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行なった。PCR 後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 400bp の PCR 産物を回収した。回収した PCR 産物を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) および制限酵素 PmaCI (宝酒造社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 400bp の PCR 断片を回収した。

一方、本項(2)で作製したプラスミド pNUTS/HM を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) および制限酵素 PmaCI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 10.5kbp の断片を回収した。

上記で得られた約 400bp の PCR 断片とプラスミド pNUTS/HM 由来の断片とを、Ligation High 溶液 (東洋紡績社製) を用いて連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 XL1-BLUE MRF' 株 (Stratagene 社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサーABI PRISM 377 により各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析し、第 15 図に示したプラスミド pNUTS/scFvM-Fc が得られたことを確認した。

2. FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞での安定発現

実施例 1 の第 4 項に記載の FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞である Ms705 細胞および親株である CHO/DG44 細胞を宿主細胞として用いて、本実施例の第 1 項で作製した抗 MUC1 scFv-Fc 発現ベクター pNUTS/scFvM-Fc を導入して、抗体 Fc に付加する糖鎖の構造が異なる二種類の抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質を生産する形質転換株を実施例 2 の第 2 項に記載の方法に従って作製した。

実施例 1 の第 4 項に記載の FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞である Ms705 細胞および親株である CHO/DG44 細胞を宿主細胞として用いて、本実施例の第 1 項で作製した抗 MUC1 scFv-Fc 発現ベクター pNUTS/scFvM-Fc を導入して、抗体 Fc に付加する糖鎖の構造が異なる二種類の抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

8 μ g のプラスミド pNUTS/scFvM-Fc を 1.6×10^8 細胞の Ms705 細胞あるいは CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]により導入後、20mL の IMDM-(10) [Ms705 細胞の場合には牛胎児血清(FCS)を、CHO/DG44 細胞の場合には透析牛血清 (dFBS) を 10% で含む IMDM 培地: GIBCO-BRL 社製]培地に懸濁し、96 ウェルマイクロプレート (住友ベークライト社製) に 100 μ L/ウェルずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、IMDM-(10)培地において 1~2 週間培養した。各ウェルから培養上清を回収し、培養上清中に含まれる抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質量を実施例 2 の第 3 項に記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に scFv-Fc の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、dhfr 遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素の阻害剤である MTX を 50nM の濃度で含む IMDM-(10)培地に懸濁し、5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、約 1 週間培養し、50nM の MTX に耐性を示す形質転換株を取得した。次に、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に 200nM の MTX を含む IMDM-(10)培地で増殖可能な形質転換株を取得した。

最終的に 200nM の濃度で MTX を含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質を生産する形質転換株を取得した。親株の CHO/DG44 細胞より得られた形質転換株を KM3487 と、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞である Ms705 細胞より得られた形質転換株を KM3486 とそれぞれ名付けた。

3. 抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質の精製

本実施例の第 2 項で得られた抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質を発現する形質転換細胞株 KM3486 および KM3487 をそれぞれ 200nM MTX を含む IMDM-(10)に 1×10^5 細胞/mL となるように懸濁し、182cm² フラスコ (Greiner 社製) に 35mL 分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、7 日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を除去し、25mL の PBS で洗浄後、EXCELL301 培地 (JRH Biosciences 社製) 30mL を注入した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、5 日間培養した後、細胞懸濁液を回収し、3000rpm、4°C の条件で 5 分間の遠心分離を行って上清をそれぞれ回収した後、0.22μm 孔径 PES Membrane (イワキ社製) を用いて濾過滅菌した。上述の方法で回収した培養上清より Prosep-A (ミリボア社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、KM3486 および KM3487 で生産される二種類の抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質をそれぞれ精製した。以後、形質転換株 KM3486 により生産される精製した抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質は、抗 MUC1 scFv-Fc(-)および形質転換株 KM3487 により生産される精製した抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質は、抗 MUC1 scFv-Fc(+)とそれぞれ表記する。

4. 精製抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質の分析

本実施例の第 3 項で精製した抗 MUC1 scFv-Fc(-)および抗 MUC1 scFv-Fc(+)の精製度および抗体に付加している全 N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を以下のようにして確認した。

(1) 抗 MUC1 scFv-Fc(-)および抗 MUC1 scFv-Fc(+)の精製度の評価

各精製抗MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質の約 3 μ g を用い、実施例 2 の第 5 項(1)に従って SDS-PAGE を行った。結果を第 16 図に示した。図の A および B 共に、抗 MUC1 scFv-Fc(-)はレーン 3 に、抗 MUC1 scFv-Fc(+)はレーン 4 にそれぞれ示した。これら二種類の精製蛋白質はそれぞれ、図の A に示す非還元条件下では約 110kDa、図の B に示す還元条件下では約 55kDa のバンドとして検出された。この結果は、実施例 2 の第 5 項 (1) の結果と一致しており、抗 MUC1 scFv-Fc(-) および抗 MUC1 scFv-Fc(+)は目的に合致したポリペプチド鎖として発現されていることが示唆された。

(2) 精製抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質の単糖組成分析

本実施例の第 3 項で得られた抗 MUC1 scFv-Fc(-)および抗 MUC1 scFv-Fc(+)の精製標品の単糖組成分析を実施例 2 の第 5 項 (2) に記載の方法に従って行った。

第 3 表に各蛋白質の単糖組成比により計算される、全 N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を示した。

(第 3 表)

抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質のフコース非含有糖鎖の割合

蛋白質名	フコースを含まない糖鎖率 (%)
抗 MUC1 scFv-Fc(+)	9%
抗 MUC1 scFv-Fc(+)	~100%

抗 MUC1 scFv-Fc(+)ではフコースが結合していない糖鎖の割合が 9%であった。一方、抗 MUC1 scFv-Fc(-)ではフコースのピークは検出限界以下であったことから、フコースが結合していない糖鎖の割合はほぼ 100%と見積もられた。

以上の結果より、抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質の N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していないことが示された。

実施例 5

抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質の活性評価

1. 抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質の MUC1 発現細胞に対する結合活性 (蛍光抗体法)

実施例 4 の第 3 項で得られた抗 MUC1 scFv-Fc(-)および抗 MUC1 scFv-Fc(+)の精製標品の結合活性を、フローサイトメーターEPICS-XL (Coulter 社製) を用いた蛍光抗体法によって評価した。

MUC1 陽性細胞であるヒト乳癌由来細胞株 T-47D 細胞(ATCC : HTB-133)を 1 ウェル当たり 2×10^5 個になるように 96 ウェル U 字プレート (Falcon 社製) に分注し、抗 MUC1 scFv-Fc(-)あるいは抗 MUC1 scFv-Fc(+)を FACS 用緩衝液で終濃度が $50 \mu\text{g/mL}$ となるように希釈した抗体溶液を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで添加して、氷中で 30 分間反応させた。FACS 用緩衝液で 2 回洗浄した後、FITC 標識抗ヒト IgG1 抗体 (Zymed 社製) を FACS 用緩衝液で 20 倍希釈したものを $50 \mu\text{L}$ /ウェルで添加した。遮光し氷中で 30 分間反応させた後、FACS 用緩衝液で 3 回洗浄し、 $500 \mu\text{L}$ の PBS に懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。また、陰性対照として MUC1 陰性細胞である Raji 細胞についても同様の操作を行った。

結果を第 17 図に示した。抗 MUC1 scFv-Fc(-)および抗 MUC1 scFv-Fc(+)は、T-47D 細胞に対しては結合を示し、Raji 細胞に対しては結合を示さなかった。また、抗 MUC1 scFv-Fc(-)および抗 MUC1 scFv-Fc(+)の T-47D 細胞への結合活性は同等であった。以上のことから、抗 MUC1 scFv-Fc(-)および抗 MUC1 scFv-Fc(+)の MUC1 陽性細胞である T-47D 細胞への結合は、Fc 融合蛋白質の scFv 部分に特異的な結合であり、この結合は抗 MUC1 scFv-Fc 融合蛋白質の Fc に付加する糖鎖中のフコース含量とは無関係であることが示された。

2. 抗 MUC1 scFv-Fc の MUC1 結合活性 (ELISA 法)

ヒト体液由来の MUC1 (Breast Tumor Antigen : シグマ社製) を PBS で 100 units/mL に希釈した後、96 穴の ELISA 用プレート (グライナー社製) に $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、室温で一時間静置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を $100 \mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を除去した後、Neuraminidase (シグマ社製) を 0.005 units/mL の濃度で、Pefabloc (Roche 社製) を 1 mg/mL の濃度でそれぞれ含む PBS を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、 37°C で 20 分間静置して MUC1 の脱シアル酸化を行った。反応後、PBS で洗浄し、 $0 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ の濃度で抗 MUC1 scFv-Fc(-)または抗 MUC1 scFv-Fc(+)を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄し、PBS で 1000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG(Fc)抗体溶液 (American Qualex

社製)を二次抗体溶液として、それぞれ50 μ L/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。Tween-PBSで洗浄後、TMB基質液(シグマ社製)を50 μ L/ウェルに加えて発色させ、OD450を測定した。また、陰性対照として、ヒト体液由来のTAG-72(シグマ社製)を吸着させたプレートについても同様の操作を行った。

結果を第18図に示した。図のAに示されるように、抗MUC1 scFv-Fc(-)および抗MUC1 scFv-Fc(+)は濃度依存的に、抗原であるMUC1に結合できることが確認され、その結合は抗MUC1 scFv-Fc(-)および抗MUC1 scFv-Fc(+)間でほぼ同等であった。一方、図のBに示されるように、陰性対照の抗原であるTAG-72に対する、抗MUC1 scFv-Fc(-)および抗MUC1 scFv-Fc(+)結合は認められなかった。以上のことから、作製した糖鎖構造の異なる二種類の抗MUC1 scFv-Fc融合蛋白質の、抗原であるMUC1への結合は、scFv部位に特異的な結合であった。

3. 抗MUC1 scFv-FcのFc γ 受容体IIIa結合活性(ELISA法)

Fc γ RIIIa(V)またはFc γ RIIIa(F)に対する抗MUC1 scFv-Fc(-)および抗MUC1 scFv-Fc(+)の結合活性を、実施例3の第3項に記載の方法に従って測定した。なお、抗MUC1 scFv-Fc(-)または抗MUC1 scFv-Fc(+)は、0~10 μ g/mLの濃度で反応時に添加した。また、発色はTMB基質液を用いて発色させ、OD450を測定した。

結果を第19図に示した。図のAに示されるように、抗MUC1 scFv-Fc(-)および抗MUC1 scFv-Fc(+)は濃度依存的にFc γ RIIIa(V)に結合することが確認でき、抗MUC1 scFv-Fc(-)のFc γ RIIIa(V)に対する結合活性は、抗MUC1 scFv-Fc(+)のFc γ RIIIa(V)に対する結合活性と比較して有意に高いことが示された。これは、図のBに示されるように、Fc γ RIIIa(F)においても同様の結果であった。また、scFv-Fc(-)およびscFv-Fc(+)とFc γ RIIIaとの間に結合が確認されたことより、scFv-FcのFc領域は、Fc γ IIIaと結合活性を保持した形で発現していることが示された。

4. 抗MUC1 scFv-Fc融合蛋白質の抗原であるMUC1存在下でのFc γ 受容体IIIa結合活性(ELISA法)

抗原であるMUC1の存在下で抗MUC1 scFv-Fc融合蛋白質のFc γ RIIIa(V)との結合活性を、実施例3の第4項に記載の方法に従って測定した。なお、反応時に抗MUC1 scFv-Fc(-)または抗MUC1 scFv-Fc(+)は、0~10 μ g/mLの濃度で添加して行った。また、発色はTMB基質液を用いて発色させ、OD450を測定した。

結果を第 20 図に示した。抗 MUC1 scFv-Fc(-) は濃度依存的に Fc γ RIIIa(V) および抗原である MUC1 に対して結合活性が認められたが、抗 MUC1 scFv-Fc(+) では発色が認められなかった。このことから、抗原である MUC1 の存在下での抗 MUC1 scFv-Fc(-) の Fc γ RIIIa に対する結合活性は、抗 MUC1 scFv-Fc(+) の Fc γ RIIIa に対する結合活性よりも高いことが確認された。

5. MUC1 発現細胞株に対する細胞傷害活性の評価 (ADCC 活性、⁵¹Cr 解離法)

上記実施例 4 の第 3 項で得られた抗 MUC1 scFv-Fc(-) および抗 MUC1 scFv-Fc(+) の精製標品の *in vitro* 細胞傷害活性を評価するため MUC1 陽性細胞であるヒト乳癌由来細胞株 T-47D に対する ADCC 活性を、実施例 3 の第 5 項に記載の方法に従って、以下のようにして測定した。また、陰性対照の細胞株として、MUC1 が発現していない細胞株である Raji 細胞を用いた。なお、反応時に抗 MUC1 scFv-Fc(-) または抗 MUC1 scFv-Fc(+) は、0~10 μ g/mL の濃度で添加して行った。

結果を第 21 図に示した。図の A に示されるように、抗 MUC1 scFv-Fc(-) または抗 MUC1 scFv-Fc(+) において、MUC1 陽性細胞である T-47D 細胞に対して濃度依存的な ADCC 活性が認められ、抗 MUC1 scFv-Fc(-) の ADCC 活性は抗 MUC1 scFv-Fc(+) による ADCC 活性よりも高かった。また、最大細胞傷害活性も抗 MUC1 scFv-Fc(+) と比べて抗 MUC1 scFv-Fc(-) の方が高く、抗 MUC1 scFv-Fc(+) が抗 MUC1 scFv-Fc(-) と同等の ADCC 活性を示すためには、100 倍の濃度が必要であった。また、図の B に示されるように、MUC1 陰性である Raji 細胞に対しては、抗 MUC1 scFv-Fc(-) および抗 MUC1 scFv-Fc(+) はともに ADCC 活性は認められなかった。

以上のことから、抗 MUC1 scFv-Fc(-) と抗 MUC1 scFv-Fc(+) の間には、全 N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合に差が認められており、この糖鎖の割合の差が、抗 MUC1 scFv-Fc(-) と抗 MUC1 scFv-Fc(+) の間の Fc γ RIIIa に対する結合活性の差となり、さらにこの Fc γ RIIIa に対する結合活性の差が、ADCC 活性の差となっていることが確認できた。

実施例 6

FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞による二種類の scFv を有する scFv-Fc 融合蛋白質の発現

抗 TAG-72scFv、抗 MUC1scFv および抗体 Fc 領域が、N 末端から順に並んでいる二種類の scFv を有する scFv-Fc 融合蛋白質 (以下、N 末端側から連結した順に、抗 MUC1 抗 TAG-72

scFvM-scFvT-Fc または抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc と称す。) 発現ベクターを、以下のようにして構築した。

1. 抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc 発現プラスミドの構築

実施例 4 の第 1 項 (2) で作製したプラスミド pNUTS/HM に、抗 MUC1 scFv の VL 部分および抗 TAG-72 scFv を以下のようにして挿入し、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc 発現プラスミドを構築した。

(1) プラスミド pNUTS/HM への抗 MUC1 scFv の VL 部分の挿入

配列番号 90 に示される塩基配列を以下の手順で設計した。実施例 4 の第 1 項 (3) で設計した VL 配列の 3' 末端側に付加したヒンジをコードする DNA の塩基配列および制限酵素 PmaCI 認識配列を除き、リンカーをコードする DNA の塩基配列および制限酵素 SpeI 認識配列を追加した。設計した配列番号 90 に示される塩基配列を、センス鎖とアンチセンス鎖が交互になるように、5' 端側から約 110 塩基ずつ計 4 本の塩基配列に分割し、隣り合う塩基配列はその末端の約 20 塩基が重複し、対合できるようにし、配列番号 86、87、88 および 91 でそれぞれ示される 4 本の合成 DNA (ファスマック社製) を作製した。

4 本の合成 DNA のうち両端に位置する 2 本については終濃度が 0.5 μ M、中間の 2 本については終濃度が 0.1 μ M となるように、PCR 反応液[2.5units KOD plus DNA Polymerase (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウム、DNA Polymerase 添付の 10 倍濃度 PCR Buffer (東洋紡績社製) を 10 分の 1 体積分含む]を調製し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製) を用いて、94°C にて 4 分間加熱した後、94°C にて 30 秒間、55°C にて 30 秒間、68°C にて 60 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行なった。PCR 後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 400bp の PCR 産物を回収した。回収した PCR 産物を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) および制限酵素 SpeI (宝酒造社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 400bp の PCR 断片を回収した。

一方、実施例 4 の第 1 項 (2) で作製したプラスミド pNUTS/HM を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) および制限酵素 SpeI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 10.5kbp の断片を回収した。

上記で得られた約 400bp の PCR 断片とプラスミド pNUTS/HM 由来の約 10.5kbp の断片を、Ligation High 溶液（東洋紡績社製）を用いて連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 XL1-BLUE MRF' 株（Stratagene 社製）を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0（Applied Biosystems 社製）を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサーABI PRISM 377 により各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析し、第 22 図に示したプラスミド pNUTS/HMLM が得られたことを確認した。

(2) プラスミド pNUTS/HMLM への抗 TAG-72 scFv の挿入

配列番号 92 に示される塩基配列を以下の手順で設計した。実施例 2 の第 1 項で設計した抗 TAG-72 抗体 CC49 の VH、VL およびリンカーを含む scFv の DNA 配列の 5' 末端側に、ベクターへのクローニングのための制限酵素 SpeI 認識配列およびリンカーをコードする塩基配列を、3' 末端側にヒンジをコードする塩基配列およびベクターへのクローニングのための制限酵素 PmaCI 認識配列を付加した。ここで、実施例 2 の第 1 項で作製した発現プラスミド pKANTEX93/CC49scFv-Fc を鋳型とした PCR によって設計した配列番号 92 に示される cDNA を得るための、配列番号 93 および 94 でそれぞれ示される 2 本の合成 DNA（ファスマック社製）を作製した。

プラスミド pKANTEX93/CC49scFv-Fc については終濃度が 10ng/ μ L、2 本のプライマーについては終濃度がそれぞれ 0.5 μ M となるように、PCR 反応液[2units KOD plus DNA Polymerase（東洋紡績社製）、0.2mM dNTPs、1mM 硫酸マグネシウム、DNA Polymerase 添付の 10 倍濃度 PCR Buffer（東洋紡績社製）を 10 分の 1 体積分含む]を調製し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems 社製）を用いて、94℃にて 4 分間加熱した後、94℃にて 30 秒間、55℃にて 30 秒間、68℃にて 60 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行なった。PCR 後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN 社製）を用いて、約 400bp の PCR 産物を回収した。回収した PCR 産物を制限酵素 SpeI（宝酒造社製）および制限酵素 PmaCI（宝酒造社製）で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN 社製）を用いて、約 800bp の PCR 断片を回収した。

一方、本項 (1) で作製したプラスミド pNUTS/HMLM を制限酵素 SpeI (宝酒造社製) および制限酵素 PmaCI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 11kbp の断片を回収した。

上記で得られた約 800bp の PCR 断片とプラスミド pNUTS/HMLM 由来の約 11kbp の断片を、Ligation High 溶液 (東洋紡績社製) を用いて連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 XL1-BLUE MRF' 株 (Stratagene 社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサーABI PRISM 377 により各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析し、第 22 図に示したプラスミド pNUTS/scFvM-scFvT-Fc が得られたことを確認した。

2. 抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc 発現プラスミドの作製

実施例 4 の第 1 項 (1) で作製したプラスミド pNUTS に、抗 MUC1 scFv および抗 TAG-72 scFv を以下のようにして挿入し、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc 発現プラスミドを構築した。

(1) 発現ベクターpNUTS への抗 TAG-72 scFv の挿入

配列番号 95 に示される塩基配列を以下の手順で設計した。実施例 2 の第 1 項で設計した抗 TAG-72 抗体 CC49 の VH、VL およびリンカーを含む scFv の DNA 配列の 5' 末端側に、ベクターへのクローニングのための制限酵素 AgeI 認識配列および Signal 配列を、3' 末端側にリンカーをコードする塩基配列およびベクターへのクローニングのための制限酵素 SpeI 認識配列を付加した。ここで、実施例 2 の第 1 項で作製した発現ベクタープラスミド

pKANTEX93/CC49scFv-Fc を鋳型とした PCR によって設計した配列番号 95 に示される cDNA を得るための、配列番号 96 および 97 でそれぞれ示される 2 本の合成 DNA (ファスマック社製) を作製した。

ベクタープラスミド pKANTEX93/CC49scFv-Fc については終濃度が 10ng/ μ L、2 本のプライマーについては終濃度がそれぞれ 0.5 μ M となるように、PCR 反応液[2units KOD plus DNA Polymerase (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 硫酸マグネシウム、DNA Polymerase 添付の 10 倍濃度 PCR Buffer (東洋紡績社製) を 10 分の 1 体積分含む]を調製し、DNA サーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製) を用いて、94℃にて 4 分間加熱した後、94℃にて 30 秒間、55℃にて 30 秒間、68℃にて 60 秒間からなる反応を 1 サイクルと

して、25 サイクル行なった。PCR 後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 400bp の PCR 産物を回収した。回収した PCR 産物を制限酵素 AgeI (Nippon Gene 社製) および制限酵素 SpeI (宝酒造社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 800bp の PCR 断片を回収した。

一方、実施例 4 の第 1 項で作製したプラスミド pNUTS を制限酵素 AgeI (Nippon Gene 社製) および制限酵素 SpeI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 10.5kbp の断片を回収した。

上記で得られた約 800bp の PCR 断片とプラスミド pNUTS 由来の約 10.5kbp の断片を、Ligation High 溶液 (東洋紡績社製) を用いて連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 XL1-BLUE MRF' 株 (Stratagene 社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサー ABI PRISM 377 により各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析し、第 2 3 図に示したプラスミド pNUTS/HTLT が得られたことを確認した。

(2) プラスミド pNUTS/ HTLT への抗 MUC1 scFv の挿入

抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc の発現ベクターを以下のようにして構築した。

配列番号 98 に示される塩基配列を以下の手順で設計した。実施例 4 の第 1 項で設計した抗 MUC1 抗体 C595 の VH、VL およびリンカーを含む scFv の DNA 配列の、5' 末端側にベクターへのクローニングのための制限酵素 SpeI 認識配列およびリンカーをコードする塩基配列を、3' 末端側にヒンジをコードする塩基配列およびベクターへのクローニングのための制限酵素 PmaCI 認識配列を付加した。ここで、実施例 4 の第 1 項で作製した発現プラスミド pNUTS/scFvM-Fc を鋳型とした PCR によって設計した配列番号 98 に示される cDNA を得るための、配列番号 94 および 99 でそれぞれ示される 2 本の合成 DNA (ファスマック社製) を作製した。

プラスミド pNUTS/scFvM-Fc については終濃度が 10ng/ μ L、2 本のプライマーについては終濃度がそれぞれ 0.5 μ M となるように、PCR 反応液[2units KOD plus DNA Polymerase (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 硫酸マグネシウム、DNA Polymerase 添付の 10 倍濃度 PCR Buffer

(東洋紡績社製)を10分の1体積分含む]を調製し、DNA サーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製)を用いて、94℃にて4分間加熱した後、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、68℃にて60秒間からなる反応を1サイクルとして、25サイクル行なった。PCR後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製)を用いて、約800bpのPCR産物を回収した。回収したPCR産物を制限酵素 SpeI (宝酒造社製)および制限酵素 PmaCI (宝酒造社製)で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製)を用いて、約800bpのPCR断片を回収した。

一方、実施例4の第1項で作製したプラスミド pNUTS/scFvM-Fc を制限酵素 SpeI (宝酒造社製)および制限酵素 PmaCI (宝酒造社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製)を用いて、約11kbpの断片を回収した。

上記で得たPCR産物由来の断片とプラスミド pNUTS/scFvM-Fc 由来の断片を、Ligation High 溶液 (東洋紡績社製)を用いて連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 XL1-BLUE MRF' 株 (Stratagene 社製)を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems 社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサーABI PRISM 377により各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列を解析し、第23図に示したプラスミド pNUTS/scFvT-scFvM-Fc が得られたことを確認した。

3. FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞での安定発現

実施例1の第4項に記載のFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞であるMs705細胞および親株であるCHO/DG44細胞を宿主細胞として用いて、本実施例の第1項で作製した抗MUC1抗TAG-72 scFvM-scFvT-Fc融合蛋白質発現ベクターpNUTS/scFvM-scFvT-Fcおよび抗TAG-72抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc融合蛋白質発現ベクターpNUTS/scFvT-scFvM-Fcをそれぞれ導入して、抗体Fcに付加する糖鎖の構造が異なる二種類の抗MUC1抗TAG-72 scFvM-scFvT-Fc融合蛋白質および抗体Fcに付加する糖鎖の構造が異なる二種類の抗TAG-72抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc融合蛋白質を生産する形質転換株を実施例2の第2項に記載の方法に従って作製した。

最終的に200nMの濃度でMTXを含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能な、抗体Fcに付加する糖鎖の構造が異なる二種類の抗MUC1抗TAG-72 scFvM-scFvT-Fc融合蛋白質および抗体Fcに

付加する糖鎖の構造が異なる二種類の抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc 融合蛋白質を生産する形質転換株を取得した。抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc については、親株の CHO/DG44 細胞より得られた形質転換株を KM3489 と、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞より得られた形質転換株を KM3488 と、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc については、親株の CHO/DG44 細胞より得られた形質転換株を KM3491 と、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞より得られた形質転換株を KM3490 とそれぞれ名付けた。

4. 二種類の scFv を有する scFv₂-Fc 融合蛋白質の精製

上記第 3 項で得られた四種類の形質転換株 KM3488、KM3489、KM3490 および KM3491 からそれぞれ、実施例 2 の第 4 項に記載の方法に従って二種類の scFv を有する scFv₂-Fc 融合蛋白質を精製した。以後、精製した二種類の scFv を有する scFv₂-Fc 融合蛋白質は、それぞれ KM3488 により生産される抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc (-)、KM3489 により生産される抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc (+)、KM3490 により生産される抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (-)、KM3491 により生産される抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (+)と表記する。

5. 精製した二種類の scFv を有する scFv₂-Fc 融合蛋白質の分析

上記第 4 項で精製した抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvM-scFvT-Fc(-)、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvM-scFvT-Fc(+)、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (-)および抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (+)の精製度および抗体に付加している全 N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を以下のようにして確認した。

(1) 精製抗 TAG-72 抗 MUC1 scFv₂-Fc 融合蛋白質の精製度の評価

各精製抗 TAG-72 抗 MUC1 scFv₂-Fc 融合蛋白質の約 3 μ g を用い、実施例 2 の第 5 項 (1) に記載の方法に従って SDS-PAGE を行った。

結果を第 16 図に示した。図中、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-)をレーン 5 に、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+)をレーン 6 に、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (-)をレーン 7 に、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (+)をレーン 8 にそれぞれ示した。4 種類の精製蛋白質はそれぞれ、非還元条件下では約 160kDa、還元条件下では約 80kDa のバンドとして検出された。この結果は精製蛋白質のアミノ酸配列より予想される分子量と一致している。

このことから、各精製抗 TAG-72 抗 MUC1 scFv₂-Fc 融合蛋白質は目的に合致したポリペプチド鎖として発現されていることが示唆された。

(2) 精製した二種類の scFv を有する scFv₂-Fc 融合蛋白質の単糖組成分析

上記第 4 項で得られた抗 TAG-72 抗 MUC1 scFv₂-Fc 融合蛋白質の精製標品の、実施例 4 の第 4 項 (2) に記載の方法に従って、単糖組成分析を行った。

結果を第 4 表に示した。抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc (+) および抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (+) ではフコースが結合していない糖鎖の割合が 9% であった。一方、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc (-) および抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (-) ではフコースのピークは検出限界以下であったことから、フコースが結合していない糖鎖の割合はほぼ 100% と見積もられた。

以上の結果より、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc (-) および抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (-) の N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していないことが示された。

(第 4 表)

二種類の scFv を有する scFv-Fc 融合蛋白質のフコース非含有糖鎖の割合

蛋白質名	フコースを含まない糖鎖率 (%)
抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc (+)	9%
抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc (-)	~100%
抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (+)	9%
抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (-)	~100%

実施例 7

二種類の scFv を有する scFv₂-Fc 融合蛋白質の活性評価

1. 二種類の scFv を有する scFv₂-Fc 融合蛋白質の TAG-72 発現細胞および MUC1 発現細胞に対する結合活性 (蛍光抗体法)

実施例 6 の第 4 項で得られた抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvM-scFvT-Fc(-)、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvM-scFvT-Fc(+)、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (-) および抗 TAG-72 抗 MUC1

scFvT-scFvM-Fc (+)の精製標品の結合活性を、フローサイトメーターEPICS-XL (Coulter 社製)を用いて、実施例 3 の第 1 項に記載の方法に従って蛍光抗体法によって評価した。なお、TAG-72 陽性かつ MUC1 陰性細胞であるヒト T 細胞リンパ腫由来細胞株 Jurkat 細胞を TAG-72 発現細胞として、MUC1 陽性かつ TAG-72 陰性細胞であるヒト乳癌由来細胞株 T-47D 細胞を MUC1 発現細胞としてそれぞれ用いた。また、陰性対照として TAG-72 陰性かつ MUC1 陰性細胞である Raji 細胞についても同様の操作を行った。なお、反応には抗 TAG-72 抗 MUC1scFv₂-Fc を 75 μ g/mL の濃度で用いた。

結果を第 2 4 図に示した。抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-)および抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+)は、Jurkat 細胞および T-47D 細胞に対しては結合を示し、Raji 細胞に対しては結合を示さなかった。また、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-)および抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+)の Jurkat 細胞および T-47D 細胞に対する結合活性はそれぞれ同等であった。

同様に抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (-)および抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (+)は、Jurkat 細胞および T-47D 細胞に対しては結合を示し、Raji 細胞に対しては結合を示さなかった。また、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (-)および抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (+)の Jurkat 細胞および T-47D 細胞に対する結合活性は同等であった。

以上のことから、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvM-scFvT-Fc(-)および抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvM-scFvT-Fc(+)の TAG-72 陽性細胞である Jurkat 細胞への結合または MUC1 陽性細胞である T-47D 細胞への結合、および抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (-)および抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (+)の TAG-72 陽性細胞である Jurkat 細胞への結合または MUC1 陽性細胞である T-47D 細胞への結合は、二種類の scFv を有する scFv₂-Fc 融合蛋白質のそれぞれの scFv 部分に特異的な結合であり、この結合は二種類の scFv を有する scFvT-scFvM-Fc 融合蛋白質の Fc に付加する糖鎖中のフコース含量とは無関係であることが示された。

2. 二種類の scFv を有する scFv₂-Fc の TAG-72 または MUC1 結合活性 (ELISA 法)

実施例 6 の第 4 項で得られた抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvM-scFvT-Fc(-)、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvM-scFvT-Fc(+), 抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (-)および抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc (+)の精製標品の TAG-72 または MUC1 に対する結合活性を、実施例 3 の第 2 項または第 3 項に記載の方法に従って ELISA 法によって評価した。なお、それぞれの二種類

の scFv を有する scFv₂-Fc は、終濃度が 0~15 μ g/mL になるようにして行った。また、発色基質には TMB 基質液（シグマ社製）を用い、OD450 を測定した。

二種類の scFv を有する scFv₂-Fc の TAG-72 に対する結合活性の結果を第 25 図に示した。図の A に示されるように、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-) および抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+) は濃度依存的に抗原である TAG-72 に結合することが確認され、その結合はほぼ同等であった。同様に、図の B に示されるように、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-) および抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+) は濃度依存的に抗原である TAG-72 に結合することが確認され、その結合はほぼ同等であった。

また、二種類の scFv を有する scFv₂-Fc の MUC1 に対する結合活性の結果を第 26 図に示した。図の A に示されるように、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-) および抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+) は濃度依存的に抗原である MUC1 に結合することが確認され、その結合はほぼ同等であった。同様に、図の B に示されるように、抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-) および抗 TAG-72 抗 MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+) は濃度依存的に抗原である MUC1 に結合することが確認され、その結合はほぼ同等であった。

以上のことから、実施例 6 の第 4 項で得られた、二種類の scFv を有する scFv₂-Fc の抗原である TAG-72 または MUC1 への結合は、糖鎖構造の違いに関わらず、それぞれの scFv 部位に特異的な結合であった。

3. 二種類の scFv を有する scFv₂-Fc の Fc γ 受容体 IIIa 結合活性 (ELISA 法)

Fc γ RIIIa(V) または Fc γ RIIIa(F) に対する、実施例 6 の第 4 項で得られた、二種類の scFv を有する scFv₂-Fc の結合活性を、実施例 3 の第 3 項に記載の方法に従って測定した。なお、各種の二種類の scFv を有する scFv₂-Fc は、0~15 μ g/mL の濃度で反応時に添加した。また、発色は TMB 基質液を用いて発色させ、OD450 を測定した。

結果を第 27 図および第 28 図にそれぞれ示した。第 27 図の A に示されるように、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-) および抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+) は濃度依存的に Fc γ RIIIa(V) に結合することが確認でき、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-) の Fc γ RIIIa(V) に対する結合活性は、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+) の Fc γ RIIIa(V) に対する結合活性と比較して有意に高いことが示された。これは、第 27 図の B に示されるように、Fc γ RIIIa(F) においても同様の結果であった。

また、第28図のAに示されるように、抗TAG-72抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)および抗TAG-72抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+)は濃度依存的にFc γ RIIIa(V)に結合することが確認でき、抗TAG-72抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)のFc γ RIIIa(V)に対する結合活性は、抗TAG-72抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+)のFc γ RIIIa(V)に対する結合活性と比較して有意に高いことが示された。これは、第28図のBに示されるように、Fc γ RIIIa(F)においても同様の結果であった。

実施例6の第4項で得られた、それぞれの二種類のscFvを有するscFv₂-FcとFc γ RIIIaとの間に結合が確認されたことより、これらのFc領域は、Fc γ RIIIaと結合活性を保持した形で発現していることが示された。また、Fc領域の糖鎖構造の違いによるFc γ RIIIaへの結合活性は、実施例3の第3項または実施例5の第3項で述べた一種類のscFvしか持たないscFv-FcとのFc領域の糖鎖構造の違いによるFc γ RIIIaへの結合活性と同様の結果であり、二種類のscFvを有するFc融合蛋白質の形状にしても、Fc領域のFc γ RIIIaへの結合活性は保持されており、該結合活性はフコースが付加されていない糖鎖が結合しているFc領域の方が、フコースが付加されている糖鎖が結合しているFc領域より高いことも同様であった。

4. 二種類のscFvを有するscFv₂-FcのTAG-72またはMUC1存在下でのFc γ 受容体RIIIa結合活性(ELISA法)

抗原であるTAG-72またはMUC1の存在下で、抗TAG-72抗MUC1 scFv₂-Fc融合蛋白質のFc γ RIIIa(V)への結合活性を、実施例3の第4項に記載の方法に従って測定した。なお、発色基質にはTMB基質液(シグマ社製)を用いて、OD450を測定した。

結果を第29図に示した。TAG-72存在下またはMUC1存在下のいずれの条件でも、フコースが付加されていない糖鎖が結合している抗MUC1抗TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-)および抗TAG-72抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)は濃度依存的にFc γ RIIIa(V)および抗原であるTAG-72に対して結合活性が認められたが、フコースが付加されている糖鎖が結合している抗MUC1抗TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+)および抗TAG-72抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+)では結合活性は認められなかった。

また、抗TAG-72抗MUC1 scFvM-scFvT-Fc(-)と抗TAG-72抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)では、抗TAG-72抗MUC1 scFvM-scFvT-Fc(-)の方がFc γ RIIIa(V)に対して高い結合活性を有していた。これは、Fc領域と融合させるscFvが2つ以上の場合には、scFvを融合させる順番により、Fc領域のFc γ RIIIa(V)への結合の強さが変わることを示唆している。

以上のことから、抗原の存在下での、Fc 領域の糖鎖構造の違いによる Fc γ IIIa への結合活性は、実施例 3 の第 4 項または実施例 5 の第 4 項で述べた一種類の scFv しか持たない scFv-Fc との Fc 領域の糖鎖構造の違いによる Fc γ IIIa への結合活性と同様の結果であり、二種類の scFv を有する Fc 融合蛋白質の形状にしても、Fc 領域の Fc γ IIIa への結合活性は保持されており、該結合活性はフコースが付加されていない糖鎖が結合している Fc 領域の方が、フコースが付加されている糖鎖が結合している Fc 領域より高いことも同様であった。

上記第 3 項および第 4 項の結果から、抗原の有無に関わらず、また、Fc 領域に融合させる scFv の数に関わらず、Fc 領域の Fc γ IIIa への結合活性はフコースが付加されていない糖鎖が結合している Fc 領域の方が、フコースが付加されている糖鎖が結合している Fc 領域より高いことが明らかとなった。

5. 二種類の scFv を有する scFv₂-Fc の TAG-72 発現細胞株または MUC1 発現細胞株に対する細胞傷害活性の評価 (ADCC 活性、⁵¹Cr 解離法)

上記実施例 6 の第 4 項で得られた、二種類の scFv を有する scFv₂-Fc の精製標品の *in vitro* 細胞傷害活性を評価するため、TAG-72 陽性 MUC1 陽性細胞であるヒト卵巣癌由来細胞株 OVCAR-3、TAG-72 陽性細胞であるヒト T 細胞由来リンパ腫細胞株 Jurkat および MUC1 陽性細胞であるヒト乳癌由来細胞株 T-47D に対する ADCC 活性を、健常人ドナーから採取したエフェクター細胞を用いて、実施例 3 の第 5 項に記載の方法に従って測定した。また、陰性対照の細胞株として、TAG-72 陰性かつ MUC1 陰性の細胞株である Raji 細胞を用いた。なお、各種の二種類の scFv を有する scFv₂-Fc は、0~15 μ g/mL の濃度で反応時に添加した。

結果を第 30 図、第 31 図および第 32 図にそれぞれ示した。

第 30 図の A に示されるように、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-) または抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+) において、TAG-72 陽性細胞である Jurkat 細胞に対して濃度依存的な ADCC 活性が認められた。また、最大細胞傷害活性も抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+) と比べて抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-) の方が高く、抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(+) が抗 MUC1 抗 TAG-72 scFvM-scFvT-Fc(-) と同等の ADCC 活性を示すためには、1000 倍の濃度が必要であった。

第 31 図の A に示されるように、標的細胞に MUC1 陽性細胞である T-47D 細胞を用いた場合にも、同様の結果であった。

また、第30図のBまたは第31図のBに示されるように、抗TAG-72 抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)または抗TAG-72 抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+)には、TAG-72 陽性細胞である Jurkat 細胞または MUC1 陽性細胞である T-47D 細胞に対して、濃度依存的な ADCC 活性が認められた。また、いずれの標的細胞においても、最大細胞傷害活性も抗TAG-72 抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+)と比べて抗TAG-72 抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)の方が高く、抗TAG-72 抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+)が抗TAG-72 抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)と同等の ADCC 活性を示すためには、1000 倍の濃度が必要であった。

一方、第32図に示されるように、TAG-72 陰性かつ MUC1 陰性である Raji 細胞に対しては、いずれの二種類の scFv を有する scFv₂-Fc において、ADCC 活性は認められなかった。

以上のことから、抗TAG-72 抗MUC1 scFvM-scFvT-Fc(-)と抗TAG-72 抗MUC1 scFvM-scFvT-Fc(+)の間、および抗TAG-72 抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)と抗TAG-72 抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+)の間には、各Fc融合蛋白質組成物中の全Fc融合蛋白質に占める、Fc融合蛋白質に結合したN-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していないFc融合蛋白質の割合に差が認められ、この割合の差が抗TAG-72 抗MUC1 scFvM-scFvT-Fc(-)と抗TAG-72 抗MUC1 scFvM-scFvT-Fc(+)との間または抗TAG-72 抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(-)と抗TAG-72 抗MUC1 scFvT-scFvM-Fc(+)との間のFc γ RIIIaに対する結合活性の差となり、さらにこのFc γ RIIIaに対する結合活性の差がADCC活性の差となっていることが確認できた。また、このような二重特異性を有するFc融合蛋白質が持つADCC活性は、TAG-72 および MUC1 の2種類の抗原に対して、それぞれ独立して細胞傷害活性が誘導されることが確認できた。

実施例 8

可溶性 TNF- α 受容体 II-Fc 融合蛋白質 (sTNFRII-Fc) の作製

1. sTNFRII-Fc 発現ベクターの作製

(1) sTNFRII をコードする DNA の構築

USP5605690 に記載の sTNFRII-Fc 融合蛋白質をコードする cDNA を PCR 法により以下のように構築した。なお、該 cDNA は、sTNFRII をコードする cDNA 配列中に存在する制限酵素 B1pI 部位で分割し、配列番号 28 に示される前半部分と配列番号 29 に示される後半部分の 2 つの

cDNA 配列を作製した。

まず、配列番号 28 に示される配列には、sTNFR_{II} をコードする配列の前半部分の 5' 末端に 87 塩基の非翻訳領域と sTNFR_{II} の分泌シグナル配列を挿入した。更に配列の 5' 末端と 3' 末端にクローニングベクターおよび発現ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む、PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列を付加した。設計した配列番号 28 に示される塩基配列を、センス鎖とアンチセンス鎖が交互になるように、5' 末端側から約 150 塩基ずつ計 4 本の塩基配列に分割し、隣り合う塩基配列はその末端の約 20 塩基が重複し、対合できるようにし、配列番号 30、31、32 および 33 の 4 本の合成オリゴヌクレオチドを合成した (ファスマック社製)。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が 0.1 μ M となるように 0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウムを含む反応液に加え、さらに 0.4 μ M M13 primer RV (宝酒造社製)、0.4 μ M M13 primer M3 (配列番号 43、GENSET 社製) および 2.5 単位の KOD polymerase (東洋紡績社製) を用いて、合計 50 μ L とし、PCR 反応を行った。反応条件は 94°C にて 30 秒間、55°C にて 30 秒間、74°C にて 60 秒間のサイクルを 25 サイクル、その後 74°C にて 5 分間を 1 サイクルで行った。PCR 後、該反応液を QIA quick PCR purification kit (QIAGEN 社製) にて精製し、制限酵素 KpnI (New England Biolabs 社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.49kb の PCR 断片を回収した。

一方、プラスミド pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 KpnI (New England Biolabs 社製) および制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 2.9kb の KpnI-HindIII 断片を回収した。

次に、上記で得られた sTNFR_{II} 前半部分の約 0.49kb の PCR 断片とプラスミド pBluescript II SK(-) 由来の KpnI-HindIII 断片を、Ligation High 溶液 (東洋紡績社製) を用いて添付の説明書に従って連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 DH5a 株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサー ABI PRISM377 により各プラスミドに挿入された PCR 断片の塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有する第 33 図に示したプラスミド

pBsIISK(-)/sTNFR^{II}-1 が得られたことを確認した。

次に、配列番号 29 に示される塩基配列には、sTNFR^{II} をコードする配列の後半部分とその 3'末端にヒト Fc のヒンジと CH2 領域の一部を組み入れた。更に配列の 5'末端と 3'末端にクロニングベクターおよび発現ベクターへクロニングするための制限酵素認識配列も含む、PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列を付加した。設計した配列番号 29 に示される塩基配列を、センス鎖とアンチセンス鎖が交互になるように、5'末端側から約 150 塩基ずつ計 4 本の塩基配列に分割し、隣り合う塩基配列はその末端の約 20 塩基が重複し、対合できるようにし、配列番号 34、35、36 および 37 の 4 本の合成オリゴヌクレオチドを合成した（ファスマック社製）。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が 0.1 μ M となるように 0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウムを含む反応液に加え、さらに 0.4 μ M M13 primer RV（宝酒造社製）、0.4 μ M M13 primer M3（GENSET 社製）および 2.5 単位の KOD polymerase（東洋紡績社製）を用いて、合計 50 μ L とし、PCR 反応を行った。反応条件は 94°C にて 30 秒間、55°C にて 30 秒間、74°C にて 60 秒間のサイクルを 25 サイクル、その後 74°C にて 5 分間を 1 サイクルで行った。PCR 後、該反応液を QIA quick PCR purification kit（QIAGEN 社製）にて精製し、制限酵素 KpnI（New England Biolabs 社製）および制限酵素 HindIII（New England Biolabs 社製）で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN 社製）を用いて、約 0.5kb の PCR 断片を回収した。

次に、上記で得られた sTNFR^{II} 後半部分の約 0.5kb の PCR 断片と上記で得られたプラスミド pBluescript II SK(-)由来の KpnI-HindIII 断片を、Ligation High 溶液（東洋紡績社製）により連結し、該反応液を用いて大腸菌 DH5a 株（東洋紡績社製）を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3（Applied Biosystems 社製）を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサー ABI PRISM377 により各プラスミドに挿入された PCR 断片の塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有する第 3 4 図に示したプラスミド pBsIISK(-)/sTNFR^{II}-2 が得られたことを確認した。

(2) sTNFR^{II}-Fc をコードする DNA の構築

ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 を制限酵素 ApaI（宝酒造社製）および制限酵素

BamHI (New England Biolabs 社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 1.0kbp のヒト IgG1 サブクラス H 鎖定常領域 (hC γ 1) を含む ApaI-BamHI 断片を回収した。同様に、プラスミド pBluescript II SK (-) (STRATAGENE 社製) も制限酵素 ApaI (宝酒造社製) および制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) で消化後、約 2.9kbp の ApaI-BamHI 断片を回収した。pKANTEX93 由来の約 1.0kbp の ApaI-BamHI 断片、および pBluescript II SK (-) 由来の約 2.9kbp の ApaI-BamHI 断片を TAKARA DNA Ligation Kit Ver.2 の solution I (宝酒造社製) により連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡社製) を形質転換してプラスミド pBsIISK(-)/hC γ 1 を構築した。

上記(1)で得られたプラスミド pBsIISK(-)/sTNFR II -1 を制限酵素 KpnI (New England Biolabs 社製) および制限酵素 BlpI (New England Biolabs 社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.48kb の KpnI-BlpI 断片を回収した。

また、上記(1)で得られたプラスミド pBsIISK(-)/sTNFR II -2 を制限酵素 BlpI (New England Biolabs 社製) および制限酵素 StyI (New England Biolabs 社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.49kb の BlpI-StyI 断片を回収した。

一方、プラスミド pBsIISK(-)/hC γ 1 を制限酵素 KpnI (New England Biolabs 社製) および制限酵素 StyI (New England Biolabs 社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 3.5kbp の KpnI-StyI 断片を回収した。

上記で得られたプラスミド pBsIISK(-)/sTNFR II -1 由来の約 0.48kb の KpnI-BlpI 断片、プラスミド pBsIISK(-)/sTNFR II -2 由来の約 0.49kb の BlpI-StyI 断片およびプラスミド pBsIISK(-)/hC γ 1 由来の約 3.5kbp の StyI-KpnI 断片を Ligation High 溶液 (東洋紡績社製) により連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 DH5a 株 (東洋紡績社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサー ABI PRISM 377 により各プラスミドに挿入された断片の塩基配列を解析し、第 35 図に示したプラスミド pBsIISK(-)/sTNFR II -Fc が得られたこと

を確認した。

(3) sTNFR^{II}-Fc 融合蛋白質発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 と本項 (2) で得られたプラスミド pBsIISK(-)/sTNFR^{II}-Fc を用いて sTNFR^{II}-Fc 融合蛋白質発現ベクター pKANTEX93/sTNFR^{II}-Fc を以下のようにして構築した。

本項 (2) で得られたプラスミド pBsIISK(-)/sTNFR^{II}-Fc を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 1.6kbp の EcoRI-BamHI 断片を回収した。

一方、ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) と BamHI (New England Biolabs 社製) で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 9.3kbp の EcoRI-BamHI 断片を回収した。

次に、上記で得られた pBsIISK(-)/sTNFR^{II}-Fc 由来の約 1.6kbp の EcoRI-BamHI 断片とプラスミド pKANTEX93 由来の約 9.3kbp の EcoRI-BamHI 断片を Ligation High 溶液 (東洋紡績社製) により連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 DH5a 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサー ABI PRISM 377 により各プラスミドに挿入された断片の塩基配列を解析し、第 36 図に示したプラスミド pKANTEX93/sTNFR^{II}-Fc が得られたことを確認した。

2. FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞での安定発現

実施例 1 の第 4 項に記載の FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞である Ms705 細胞および親株である CHO/DG44 細胞を宿主細胞として用いて、本実施例の第 1 項で作製した sTNFR^{II}-Fc 融合蛋白質発現ベクター pKANTEX93/sTNFR^{II}-Fc を導入して、sTNFR^{II}-Fc 融合蛋白質の安定生産細胞を実施例 2 の第 2 項に記載の方法で作製した。

最終的に 600 μ g/mL の G418 および 200nM の MTX を含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、sTNFR^{II}-Fc 融合蛋白質を生産する形質転換株を取得した。FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞より得られた形質転換株を KC1194 と名付けた。

3. sTNFR^{II}-Fc 融合蛋白質の精製

本実施例の第2項で作製した sTNFRII-Fc 融合蛋白質の生産細胞から実施例2の第4項に記載の方法で sTNFRII-Fc 融合蛋白質を精製した。以後、精製した sTNFRII-Fc 融合蛋白質はそれぞれ KC1194 により生産される sTNFRII-Fc(-) および親株の CHO/DG44 細胞により生産される sTNFRII-Fc(+) と表記する。

4. 精製 sTNFRII-Fc 融合蛋白質の分析

本実施例の第3項で精製した sTNFRII-Fc(-) および sTNFRII-Fc(+) の精製度および Fc 領域中に付加している糖鎖中のフコース含量を以下のようにして確認した。

(1) sTNFRII-Fc(-) および sTNFRII-Fc(+) の精製度の評価

本実施例の第3項で精製した各精製 sTNFRII-Fc 融合蛋白質の約 3 μ g を用いて、実施例2の第5項(1)に記載の方法に従って SDS-PAGE を行った。

結果を第37図に示した。二種類の精製蛋白質はそれぞれ、非還元条件下は約 140kDa、還元条件下では約 70kDa のバンドとして検出された。この結果は、sTNFRII-Fc 融合蛋白質の分子量が、非還元条件下では約 140kDa であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、約 70kDa の構成単位に分解されるという報告 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 36, 61 (1999)] と一致し、宿主の異なる二種類の sTNFRII-Fc(-) および sTNFRII-Fc(+) で泳動パターンが類似していることから、sTNFRII-Fc(-) および sTNFRII-Fc(+) が目的に合致したポリペプチド鎖として発現されていることが示唆された。

(2) 精製 sTNFRII-Fc 融合蛋白質の単糖組成分析

本実施例の第3項で得られた sTNFRII-Fc(-) および sTNFRII-Fc(+) の精製標品の単糖組成分析を、実施例2の第5項(2)に記載の方法に従って行った。但し、sTNFRII には2箇所の N-グリコシド結合複合型糖鎖結合部位が存在し、さらに複数の O-グリコシド結合型糖鎖結合部位も存在することが知られているため、各精製 sTNFRII-Fc 融合蛋白質から Fc 領域の断片を精製し、該断片を用いて単糖組成分析を行った。

各精製 sTNFRII-Fc 融合蛋白質 500 μ g とリシルエンドペプチダーゼ 5 μ g を 50mmol/L トリス緩衝液 pH8.5 に懸濁し、総量 5mL として 37°C、1時間反応させた。反応直後に MabSelect (ファルマシア社製) カラムを使用説明書に従い、用いて Fc 領域の断片を精製した。

結果を第5表に示した。sTNFRII-Fc(+) ではフコースが結合していない糖鎖の割合が7%であった。一方、sTNFRII-Fc(-) ではフコースのピークは検出限界以下であったことから、フコ

ースが結合していない糖鎖の割合はほぼ 100%と見積もられた。

以上の結果より、sTNFR^{II}-Fc(-)の N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していないことが示された。

(第 5 表)

sTNFR^{II}-Fc 融合蛋白質のフコース非含有糖鎖の割合

蛋白質名 フコースを含まない糖鎖率 (%)

sTNFR^{II}-Fc (+) 7%

sTNFR^{II}-Fc (-) ~100%

実施例 9

sTNFR^{II}-Fc 融合蛋白質の活性評価

1. sTNFR^{II}-Fc 融合蛋白質の抗 TNFR^{II} 抗体に対する反応性 (ELISA 法)

抗 TNFR^{II} 抗体 (R&D 社製) を PBS で希釈して 1 μ g/mL とし、96 穴の ELISA 用プレート (グライナー社製) に、50 μ L/ウェルで分注し、4℃で一晩静置して吸着させた。PBS で洗浄後、1% BSA-PBS を 100 μ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を除去し、sTNFR^{II}-Fc (-)または sTNFR^{II}-Fc (+)を 50 μ L/ウェルで加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄し、PBS で 500 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG(Fc)抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、それぞれ 50 μ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50 μ L/ウェルで加えて発色させ、OD₄₁₅ を測定した。

結果を第 38 図に示した。sTNFR^{II}-Fc(-)および sTNFR^{II}-Fc(+)は、濃度依存的に抗 TNFR^{II} 抗体に結合することが確認でき、その結合はほぼ同等であったことから、作製した糖鎖構造の異なる二種類の sTNFR^{II}-Fc(-)および sTNFR^{II}-Fc(+)の TNFR^{II} 部分に特異的な結合であり、この結合は sTNFR^{II}-Fc 融合蛋白質の Fc に付加する糖鎖中のフコース含量とは無関係であることが示された。

2. sTNFR^{II}-Fc 融合蛋白質の Fc γ 受容体 IIIa 結合活性 (ELISA 法)

実施例 3 の第 3 項に記載の方法と同様に行った。但し、測定した sTNFR^{II}-Fc 融合蛋白質の

濃度範囲は100nmol/Lからとした。

結果を第39図に示した。sTNFRII-Fc(-)およびsTNFRII-Fc(+)について濃度依存的な結合が確認され、Fc γ RIIIaに対するsTNFRII-Fc(-)の結合活性は、sTNFRII-Fc(+)の結合活性よりも高いものであり、二種類のFc γ RIIIaの多形の違いにかかわらず同様であった。また、sTNFRII-Fc(-)およびsTNFRII-Fc(+)とFc γ RIIIaとの間に結合が確認されたことより、sTNFRII-FcのFc領域は、Fc γ RIIIaと結合しうる正常な立体構造をとっていることが示された。

3. sTNFRII-Fc 融合蛋白質の TNF- α 中和活性

TNF- α 感受性細胞であるL929細胞[J. Natl. Cancer Inst., 9, 229 (1948)]を用いて中和活性の測定を行った。MEM-FBS(10)培地(10%FBS、10 μ g/mL Gentamicinを含むMEM培地)で培養したL929細胞をトリプシン-EDTA(GIBCO-BRL社製)で処理した後、回収し、MEM-FBS(10)培地に3 \times 10⁵cells/mLに調製し、96well 平底プレートに100 μ L/wellで分注した。5%CO₂インキュベーター内で、37°C、24時間培養後、細胞を吸わないように培地を除去した。各ウェルにMEM-FBS(10)培地を100 μ L、0.05ng/mLのマウスTNF- α (R&D社製)を50 μ L、各最終濃度の5倍濃度のsTNFRII-Fc(-)あるいはsTNFRII-Fc(+)を50 μ L、2.5 μ g/mLのActinomycin D(MBL社製)を50 μ L加え計250 μ L/wellとし、さらに24時間培養した。細胞を吸わないように培地を除去し、PBS(-)を100 μ L/well加え、再度細胞を吸わないようにPBS(-)を除去し、10分以上風乾させた。0.05% Crystal Violet 溶液(和光純薬工業社製)を50 μ L/wellで加え、10分以上放置した。150 μ L/wellのメタノール(ナカライテスク社製)を加え、プレートリーダーにて590nmの吸光度を測定した。Actinomycin D存在下でのTNF- α 非添加時の細胞を100%、添加時の細胞を0%として各濃度におけるTNF- α 中和活性を求めた。

結果を第40図に示した。sTNFRII-Fc(-)およびsTNFRII-Fc(+)は、濃度依存的にマウスTNF- α の活性を阻害し、その中和活性はほぼ同等であったことから、作製した糖鎖構造の異なる二種類のsTNFRII-Fc(-)およびsTNFRII-Fc(+)の糖鎖に起因するTNF- α 中和活性に違いが無いことが確認された。

4. sTNFRII-Fc 融合蛋白質の ADCC 活性 (乳酸デヒドロゲナーゼ法)

sTNFR_{II}-Fc 融合蛋白質の膜型ヒト TNF- α 発現マウス T 細胞腫瘍株 EL4 (ATCC TIB-39) (以下、TNF- α /EL4 と記す) に対する ADCC 活性を、健常人ドナーから採取した末梢血単核球画分をエフェクター細胞として以下のようにして測定した。

(1) TNF- α /EL4 の作製

(1-1) ヒトリンパ節由来 1 本鎖 cDNA の作製

ヒトリンパ節由来 Poly A⁺ RNA (BD Biosciences Clontech 社製) の 1 μ g より、SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen 社製) を用いて添付の説明書に従い、1 本鎖 cDNA を合成した。合成後、最終液量を 1mL とし、これを 5 倍希釈した溶液を以下の反応に用いた。

(1-2) 膜型ヒト TNF- α をコードする cDNA の作製

ヒト TNF- α の全長配列において 77 番目から 88 番目までのプロテアーゼによる認識部位を含む 12 残基を欠失させた TNF- α を NIH 3T3 細胞で発現させると、TNF- α はプロテアーゼにより切断されず、ヒト TNF- α が細胞膜上に発現する [Cell, 63, 251 (1990)]。そこで、77 番目から 88 番目までの 12 残基を欠失したヒト TNF- α をコードする cDNA を以下のようにして構築した。

上記 (1-1) で作製した cDNA 溶液の 5 μ L を鋳型とし、終濃度 0.4 μ M の配列番号 100 および配列番号 101 でそれぞれ示される合成 DNA をプライマーとして添加し、PCR 反応液 [1unit KOD-Plus- DNA Polymerase、0.2mM dNTPs、1mM 硫酸マグネシウム、1 倍濃度の KOD-Plus- DNA Polymerase 緩衝液 (いずれも東洋紡績社製)] を調製し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製) を用いて、94 $^{\circ}$ C にて 4 分間加熱した後、94 $^{\circ}$ C にて 30 秒間、55 $^{\circ}$ C にて 30 秒間、68 $^{\circ}$ C にて 60 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、30 サイクル行なった。本反応により、ヒト TNF- α の C 末端側約 440bp が増幅される。PCR 後、該反応液を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 440bp の PCR 断片を回収した。

プラスミド pBluescriptII SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 AflIII (New England Biolabs 社製) で消化後、修飾酵素 Mung Bean Nuclease (宝酒造社製) で平滑末端化後に Ligation High (東洋紡績社製) を用いて自己連結反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東

洋紡績社製) を形質転換し、得られた形質転換株のクローンよりプラスミド DNA を調製し、AflIII 認識部位が欠失したプラスミド pBSAAflIII(-)を取得した。

上記プラスミド pBSAAflIII(-)を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、上記と同様にして約 2.9kbp の EcoRI-BamHI 断片を回収した。

上記で得られた約 440bp の PCR 断片とプラスミド pBSAAflIII(-)由来の約 2.9kbp の EcoRI-BamHI 断片を、Ligation High (東洋紡績社製) を用いて連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンよりプラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサーABI PRISM 377 によりプラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析した結果、目的のプラスミド Δ TNF- α pBSAAflIII(-)が得られたことを確認した。

次に、ヒト TNF- α の N 末端側約 300bp をセンス鎖とアンチセンス鎖が交互になるように 5' 末端から 4 本の塩基配列に分割し、隣り合う配列はその末端の約 20b が重複し、対合可能なように設計した。さらに配列番号 102 と 105 の末端にはクローニング用の制限酵素認識配列を付加し、配列番号 102、103、104 および 105 の 4 本の合成 DNA (ファスマック社製) を合成した。

各オリゴヌクレオチドを終濃度が 0.1 μ M、さらに終濃度 0.5 μ M の配列番号 106 および配列番号 107 の合成オリゴヌクレオチドを増幅プライマーとして添加し、PCR 反応液[2unit KOD-Plus- DNA Polymerase、0.2mM dNTPs、1mM 硫酸マグネシウム、1 倍濃度の KOD-Plus- DNA Polymerase 緩衝液 (いずれも東洋紡績社製)]を調製し、DNA サーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製) を用いて、94°Cにて 30 秒間、55°Cにて 30 秒間、74°Cにて 60 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル、その後 74°Cにて 5 分間を 1 サイクル行った。PCR 後、該反応液を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 AflIII (New England Biolabs 社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 300bp の PCR 断片を回収した。

上記で得られたプラスミド Δ TNF- α pBSAflIII(-)を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 AflIII (New England Biolabs 社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、上記と同様にして約 3.2kbp の EcoRI-AflIII 断片を回収した。

上記で得られた約 300bp の PCR 断片とプラスミド Δ TNF- α pBSAflIII(-)由来の約 3.2kbp の EcoRI-AflIII 断片を、Ligation High (東洋紡績社製) を用いて連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンよりプラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサー ABI PRISM 377 によりプラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析した結果、目的の膜型ヒト TNF- α をコードする cDNA を有するプラスミド Δ 1-12TNF- α pBS が得られたことを確認した。配列番号 108 に構築した膜型ヒト TNF- α の cDNA 配列を、配列番号 109 に膜型ヒト TNF- α の推定アミノ酸配列をそれぞれ示した。

(1-3) 膜型ヒト TNF- α 発現ベクターの構築

上記 (1-2) で得られたプラスミド Δ 1-12TNF- α pBS を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、上記と同様にして約 0.72kbp の EcoRI-BamHI 断片を回収した。

上記で得られたプラスミド Δ 1-12TNF- α pBS 由来の約 0.72kbp の EcoRI-BamHI 断片と実施例 8 の 1 項 (3) で調製したヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 由来の約 9.3kbp の EcoRI-BamHI 断片を、Ligation High (東洋紡績社製) を用いて連結反応を行い、該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンよりプラスミド DNA を調製した結果、第 41 図に示した膜型ヒト TNF- α 発現ベクター pKANTEX Δ 1-12TNF- α が得られたことを確認した。

(1-4) TNF- α /EL4 の作製

8 μ g の上記 (1-3) で得られたプラスミド pKANTEX Δ 1-12TNF- α を 3×10^6 細胞の EL4 細胞へエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により導入後、60mL の RPMI1640(10)培地 [10%FCS を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen 社製)] に懸濁し、96 ウェルマイクロプレート (住友ベークライト社製) に 200 μ L/ウェルずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養後、0.5mg/mL の濃度で G418 を含む RPMI1640(10)培地において、

1~2 週間培養した。培養後、増殖が確認された薬剤耐性株を用いて膜型ヒト TNF- α の発現を以下のようにして検討した。

薬剤耐性株あるいは親株である EL4 細胞を 5×10^5 細胞/ $50 \mu\text{L}$ となるように 40 倍希釈のヒト免疫グロブリン溶液 (ウェルファイド社製) および 5 倍希釈の FITC 標識抗ヒト TNF- α 抗体溶液 (R&D 社製) を含む 1%BSA-PBS で懸濁し、96 ウェル U 字底プレートに分注して 4°C 、遮光下で 30 分間反応させた。反応後、1%BSA-PBS で 2 回洗浄後、1mL の PBS で懸濁し、フローサイトメーターで解析した。

結果を第 4 2 図に示した。第 4 2 図に示したように、薬剤耐性株 7 で膜型ヒト TNF- α の発現が確認された。一方、親株である EL4 細胞では膜型ヒト TNF- α の発現は確認されなかった。

(2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人末梢血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.3mL を加え穏やかに混合した。これを Lymphoprep (Axis-Shield 社製) を用いて使用説明書に従い、単核球層を分離した。RPMI1640F(-)-FCS(5)培地 [5%FCS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン (Invitrogen 社製) を含むフェノールレッド不含 RPMI1640 培地 (Invitrogen 社製)] で 2 回遠心分離、洗浄操作を行い、RPMI1640F(-)-FCS(5)培地を加えて 5×10^6 細胞/mL に調整し、エフェクター細胞溶液とした。

(3) 標的細胞溶液の調製

上記で作製した TNF- α /EL4 (薬剤耐性株 7) を 2×10^5 細胞/mL の濃度になるように RPMI1640F(-)-FCS(5)培地に懸濁し、標的細胞溶液とした。

(4) ADCC 活性の測定

96 ウェル U 字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 (2) で調製したエフェクター細胞溶液の $50 \mu\text{L}$ (2.5×10^5 細胞/ウェル) を分注した。次いで上記 (3) で調製した標的細胞溶液を $50 \mu\text{L}$ (1×10^4 細胞/ウェル) で分注し、エフェクター細胞と標的細胞の比が 25:1 となるように添加した。更に、本実施例の第 2 項で作製した各種 sTNFRII-Fc 融合蛋白質をそれぞれ最終濃度が $0.00001 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ となるように加えて全量を $150 \mu\text{L}$ とし、遠心分離 (700rpm、5 分間) 後、 37°C で 4 時間反応させた。反応後、遠心分離 (1200rpm、5 分間) して反応溶液を細胞群と上清とに分離し、上清の $50 \mu\text{L}$ を 96 ウェル平底プレートに分注した。分注した上清に CytoTox96-Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 社製) に付属の基質反応液

を 50 μ L/ウェルで添加し、室温、遮光下で 30 分間反応させた。反応後、付属の Stop solution を 50 μ L/ウェルで添加し、OD490nm の吸光度を測定し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ（以下、LDH と記す）の量を測定した。sTNFRII-Fc 融合蛋白質の特異的な LDH 放出活性は、各測定値から標的細胞とエフェクター細胞のみを含むウェルの値を差し引いて求めた。標的細胞の全 LDH 量としては反応時に付属の Lysis buffer を 1/10 量添加したウェルの値を測定し、また、標的細胞の自然放出 LDH 量としては培地のみで反応させたウェルの値を測定した。これらの値より下記式に従い、ADCC 活性（%）を算出した。

ADCC 活性（%）= {各サンプル濃度での特異的 LDH 測定値 / （全 LDH 測定値 - 自然放出 LDH 測定値）} \times 100

結果を第 4 3 図に示した。sTNFRII-Fc(-)は TNF- α /EL4 に対して濃度依存的な ADCC 活性を示した。一方、sTNFRII-Fc(+)では、測定した濃度範囲では非常に低い ADCC 活性しか認められなかった。以上の結果は、抗体 Fc 領域の N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンのフコースを除去することにより、Fc 融合蛋白質の ADCC 活性を著しく高めることが可能であることを示している。

（実施例 10）

CD2 結合性 LFA-3 ドメイン-Fc 融合蛋白質（LFA-3-Fc）の作製

1. LFA-3-Fc 融合蛋白質発現ベクターの作製

（1）CD2 結合性 LFA-3 ドメインをコードする DNA の構築

USP5914111 に記載の CD2 結合性 LFA-3 ドメインの Fc 融合蛋白質をコードする cDNA を以下のように構築した。

配列番号 38 に示される塩基配列には、CD2 結合性 LFA-3 ドメインをコードする配列の 5' 末端に 9 塩基の非翻訳領域と LFA-3 の分泌シグナル配列を組み入れた。3' 末端にはヒト Fc のヒンジ（N 末から 5 残基欠損したもの）と CH₂ 領域の一部を組み入れた。さらに配列の 5' 末端と 3' 末端に、クローニングベクターおよび発現ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む、PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列を付加した。設計した配列番号 38 に示される塩基配列を、センス鎖、アンチセンス鎖が交互になるように、5' 末端側から約 120~140 塩基ずつ計 4 本の塩基配列に分割し、隣り合う塩基配列はその末端に約 20 塩

基が重複し、対合できるようにし、配列番号 39、40、41 および 42 の 4 本の合成オリゴヌクレオチドを合成した（ファスマック社製）。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が $0.1\mu\text{M}$ となるように 0.2mM dNTPs、 1mM 塩化マグネシウムを含む反応液に加え、さらに $0.4\mu\text{M}$ M13 primer RV（宝酒造社製）、 $0.4\mu\text{M}$ M13 primer M3（GENSET 社製）および 2.5 単位の KOD polymerase（東洋紡績社製）を用いて、合計 $50\mu\text{l}$ とし、PCR 反応を行った。反応条件は 94°C にて 30 秒間、 55°C にて 30 秒間、 74°C にて 60 秒間のサイクルを 25 サイクル、その後 74°C にて 5 分間を 1 サイクルで行った。該反応液を QIA quick PCR purification kit（QIAGEN 社製）にて精製し、制限酵素 KpnI（New England Biolabs 社製）および制限酵素 AlwNI（New England Biolabs 社製）で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN 社製）を用いて、約 0.42kb の KpnI-AlwNI 断片を回収した。

次に、実施例 8 の第 1 項(2)で作製したプラスミド pBsIISK(-)/hC γ 1 を制限酵素 AlwNI（New England Biolabs 社製）および制限酵素 AflIII（New England Biolabs 社製）で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN 社製）を用いて、約 1.1kb の AlwNI-AflIII 断片を回収した。一方で、同プラスミドを制限酵素 AflIII（New England Biolabs 社製）および制限酵素 KpnI（New England Biolabs 社製）で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN 社製）を用いて、約 2.5kb の AflIII-KpnI 断片を回収した。

上記で得られた PCR 由来の約 0.42kb の KpnI-AlwNI 断片、プラスミド pBsIISK(-)/hC γ 1 由来の約 2.5kb の AlwNI-AflIII 断片およびプラスミド pBsIISK(-)/hC γ 1 由来の AflIII-KpnI 断片を Ligation High 溶液（東洋紡績社製）を用いて添付の説明書に従って連結した。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5a 株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3（Applied Biosystems 社製）を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサー ABI PRISM377 により各プラスミドに挿入された PCR 断片の塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有する第 4 4 図に示したプラスミド pBsIISK(-)/LFA-3-Fc が得られたことを確認した。

(2) LFA-3-Fc 融合蛋白質発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93と本項(1)で得られたプラスミド pBsIISK(-)/LFA-3-Fcを用いてLFA-3-Fc融合蛋白質発現ベクターpKANTEX93/LFA-3-Fcを以下のようにして構築した。

本項(1)で得られたプラスミド pBsIISK(-)/LFA-3-Fcを制限酵素 EcoRI (宝酒造社製)と制限酵素 XcmI (New England Biolabs 社製)で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製)を用いて、約0.1kbの EcoRI-XcmI断片を回収した。

次に、ヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93を制限酵素 XcmI (New England Biolabs 社製)と BamHI (New England Biolabs 社製)で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製)を用いて、約1kbの XcmI-BamHI断片を回収した。同プラスミドを制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製)と EcoRI (宝酒造社製)で消化後、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製)を用いて、約9.3kbの BamHI-EcoRI断片を回収した。

次に、上記で得られた pBsIISK(-)/LFA-3-Fc 由来 EcoRI-XcmI断片とプラスミド pKANTEX93由来の XcmI-BamHI断片と BamHI-EcoRI断片をLigation High 溶液(東洋紡績社製)を用いて添付の説明書に従って連結した。このようにして得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5a株(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3 (Applied Biosystems 社製)を用いて同社のシーケンサーABI PRISM3700により塩基配列の解析を行った。解析の結果、目的の塩基配列を有する第45図に示したプラスミド pKANTEX93/LFA-3-Fcが得られたことを確認した。

2. FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞での安定発現

実施例1の第4項に記載のFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞およびその親株であるCHO/DG44細胞を宿主細胞として用いて、本実施例の第1項で作製したLFA-3-Fc融合蛋白質発現ベクターpKANTEX93/LFA-3-Fcを導入して、LFA-3-Fc融合蛋白質の安定生産細胞を実施例2の第2項に記載の方法に従って作製した。ただし、デヒドロ葉酸還元酵素遺伝子を利用した遺伝子増幅は行っていない。

最終的に600 μ g/mLのG418を含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、LFA-3-Fc融合蛋

白質を生産する形質転換株を取得した。FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞より得られた形質転換株を KC1198 と名付けた。

3. CD2 結合性 LFA-3 ドメイン-Fc 融合蛋白質の精製

上記実施例 6 の第 2 項で作製した LFA-3-Fc 融合蛋白質の生産細胞を EXCELL301 培地 (JRH 社製) を用いて 1000mL のスケールで培養した。培養上清より実施例 2 の第 4 項に記載の方法に従って LFA-3-Fc 融合蛋白質を精製した。以後、精製した LFA-3-Fc 融合蛋白質はそれぞれ親株の CHO/DG44 細胞により生産される LFA-3-Fc(+) と、KC1198 により生産される LFA-3-Fc(-) と表記する。

4. 精製 LFA-3-Fc 融合蛋白質の分析

本実施例の第 3 項で精製した LFA-3-Fc (-) および LFA-3-Fc(+) の精製度および Fc 領域中に付加している糖鎖中のフコース含量を以下のようにして確認した。

(1) LFA-3-Fc(-) および LFA-3-Fc(+) の精製度の評価

各精製 LFA-3-Fc 融合蛋白質の約 2 μ g を用いて、実施例 2 の第 5 項 (1) に記載の方法に従って SDS-PAGE を行った。結果を第 4 6 図に示した。二種類の精製蛋白質はそれぞれ、非還元条件下は約 115kDa、還元条件下では約 60KDa のバンドとして検出された。この結果は、LFA-3-Fc 融合蛋白質の分子量が、非還元条件下では約 115KDa であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、約 60KDa の構成単位に分解されるという報告[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 36, 61 (1999)]と一致し、宿主の異なる二種類の LFA-3-Fc(-) および LFA-3-Fc(+) で泳動パターンが類似していることから、LFA-3-Fc(-) および LFA-3-Fc(+) が発現ベクターにコードされた通りのポリペプチド鎖として発現されていることが示唆された。

(2) 精製 LFA-3-Fc 融合蛋白質の単糖組成分析

本実施例の第 3 項で得られた LFA-3-Fc(-) および LFA-3-Fc(+) の精製標品の単糖組成分析を実施例 2 の第 5 項 (2) に記載の方法で行った。但し、CD2 結合性 LFA-3 ドメインには 3 箇所の N-グリコシド結合複合型糖鎖結合部位が存在 (USP5614111) することが知られているため、各精製 LFA-3-Fc 融合蛋白質から Fc 領域の断片を精製し、該断片を用いて単糖組成分析を行った。

本実施例の第 3 項で精製した LFA-3-Fc 融合蛋白質各 500 μ g とリシルエンドペプチダーゼ 5 μ g を 50mmol/L トリス緩衝液 pH8.5 に懸濁し、総量 5mL として 37°C、1 時間反応させた。反

応直後に MabSelect (ファルマシア社製) カラムを使用説明書に従い、用いて Fc 断片を精製した。

結果を第 6 表に示した。LFA-3-Fc(+)ではフコースが結合していない糖鎖の割合が 7%であった。一方、LFA-3-Fc(-)ではフコースのピークは検出限界以下であったことから、フコースが結合していない糖鎖の割合はほぼ 100%と見積もられた。

以上の結果より、LFA-3-Fc(-)の N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していないことが示された。

第 6 表

LFA-3-Fc 融合蛋白質のフコース非含有糖鎖の割合

蛋白質名 フコースを含まない糖鎖率 (%)

LFA-3-Fc (+) 7%

LFA-3-Fc (-) ~100%

実施例 11

CD2 結合性 LFA-3 ドメイン-Fc 融合蛋白質の活性評価

1. 膜表面上の CD2 分子への結合性(蛍光抗体法)

実施例 6 の第 3 項で作製した LFA-3-Fc 融合蛋白質である LFA-3-Fc(-)および LFA-3-Fc (+)との結合活性を有する CD2 に対する反応性を、蛍光抗体法により以下のように検討した。CD2 発現細胞株としては、CCRF-CEM 細胞(ATCC CCL-119)を用いた。

1 ウェル当たり 2×10^5 個の CCRF-CEM 細胞を 96 ウェル U 字プレートに分注し、公知の方法[酵素抗体法：学際企画刊 (1985)] で LFA-3-Fc(-)および LFA-3-Fc (+)を FACS 用緩衝液で 435nmol/L から適宜希釈した溶液を 100 μ L/ウェルとして加え、水中で 30 分間反応させた。FACS 用緩衝液で 2 回洗浄後、PE 標識抗ヒト IgG(Fc γ) 抗体(ベックマン・コールター社製)を FACS 用緩衝液にて 50 倍に希釈した溶液を 50 μ L/ウェルで加えた。遮光し水中で 30 分間反応後、FACS 用緩衝液で 3 回洗浄し、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。

第 4 7 図に示したように、LFA-3-Fc(-)および LFA-3-Fc(+)の CD2 への結合活性は同程度であった。CD2 と LFA-3 の結合には糖鎖修飾の影響が大きいと報告されているが [Trends in

Glycoscience and Glycotechnology, 11,1 (1999)]、フコースの結合していない LFA-3-Fc(-) 分子でもその結合活性には影響を及ぼさないことが示された。

2. Fc γ RIIIa への結合活性

実施例 3 の第 3 項に記載の方法と同様に行った。但し、測定した LFA-3-Fc 融合蛋白質の濃度範囲は 33nmol/L からとした。

結果を第 48 図に示した。LFA-3-Fc(-) および sLFA-3-Fc(+) は濃度依存的に Fc γ RIIIa に結合することが確認され、Fc γ RIIIa に対する LFA-3-Fc(-) の Fc γ RIIIa に対する結合活性は、LFA-3-Fc(+) のそれよりも高いものであった。この結果は、二種類の Fc γ RIIIa の多形で同様の結果であった。

LFA-3-Fc(-) と LFA-3-Fc(+) の間には、Fc γ RIIIa に対する結合活性および Fc 領域に結合する糖鎖中のフコース含量に差が認められており、Fc γ RIIIa に対する結合活性の差は Fc 領域に結合する糖鎖中のフコース含量の差に起因していることを明確に示したものである。一方、LFA-3 領域のフコース含量は CD2 との結合には何ら影響を与えないことから、抗体 Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンのフコースを除去することで、抗体 Fc 領域が介在するエフェクター活性を人為的に調節できることを明確に示している。

3. CD2 結合性 LFA-3 ドメイン-Fc 融合蛋白質の ADCC 活性

CD2 結合性 LFA-3 ドメイン-Fc 融合蛋白質の CD2 陽性ヒト T 細胞リンパ腫細胞株 Jurkat に対する ADCC 活性を、健常人ドナーから採取した末梢血単核球画分をエフェクター細胞として以下のようにして測定した。

(1) エフェクター細胞溶液の調製

健常人末梢血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.3mL を加え穏やかに混合した。これを Lymphoprep (Axis-Shield 社製) を用いて使用説明書に従い、単核球層を分離した。RPMI1640F(-)-FCS(5) 培地 [5%FCS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン (Invitrogen 社製) を含むフェノールレッド不含 RPMI1640 培地 (Invitrogen 社製)] で 2 回遠心分離、洗浄操作を行い、RPMI1640F(-)-FCS(5) 培地を加えて 5×10^6 細胞/mL に調整し、エフェクター細胞溶液とした。

(2) 標的細胞溶液の調製

Jurkat 細胞を 2×10^5 細胞/mL の濃度になるように RPMI1640F(-)-FCS(5)培地に懸濁し、標的細胞溶液とした。

(3) ADCC 活性の測定

96 ウェル U 字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに本項 (1) で調製したエフェクター細胞溶液の $50 \mu\text{L}$ (2.5×10^5 細胞/ウェル) を分注した。次いで本項 (2) で調製した標的細胞溶液を $50 \mu\text{L}$ (1×10^4 細胞/ウェル) で分注し、エフェクター細胞と標的細胞の比が 25:1 となるように添加した。更に、本実施例の第 2 項で作製した各種 LFA-3-Fc 融合蛋白質をそれぞれ最終濃度が $0.00001 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ となるように加えて全量を $150 \mu\text{L}$ とし、遠心分離 (700rpm、5 分間) 後、 37°C で 4 時間反応させた。反応後、遠心分離 (1200rpm、5 分間) して反応溶液を細胞群と上清とに分離し、上清の $50 \mu\text{L}$ を 96 ウェル平底プレートに分注した。分注した上清に CytoTox96-Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 社製) に付属の基質反応液を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで添加し、室温、遮光下で 30 分間反応させた。反応後、付属の Stop solution を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで添加し、OD490nm の吸光度を測定し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼの量を測定し、細胞傷害活性とした。LFA-3-Fc 融合蛋白質の特異的な細胞傷害活性は、各測定値から標的細胞とエフェクター細胞のみを含むウェルの値を差し引いて求めた。

結果を第 49 図に示した。LFA-3-Fc(-)および LFA-3-Fc(+)は Jurkat 細胞に対して濃度依存的な ADCC 活性を示し、その活性は LFA-3-Fc(-)の方が約 100 倍高かった。以上の結果は、抗体 Fc 領域の N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンのフコースを除去することにより、Fc 融合蛋白質の ADCC 活性を高めることが可能であることを示している。

参考例

可溶性ヒト Fc γ RIIIa 蛋白質の作製

1. 可溶性ヒト Fc γ RIIIa 蛋白質の発現ベクターの構築

(1) ヒト末梢血単核球 cDNA の作製

健康人の静脈血 30mL にヘパリンナトリウム (武田薬品社製)を加え穏やかに混合した。これを Lymphoprep (第一化学薬品社製)を用いて使用説明書に従って単核球層を分離した。

RPMI1640 培地で 1 回、RPMI1640-FCS(10)培地で 1 回遠心分離して洗浄後、RPMI1640-FBS(10) 中に懸濁した 2×10^6 個/mL の末梢血単核球懸濁液を調製した。該末梢血単核球懸濁液の 5mL を室温下 800rpm で 5 分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、5mL の PBS に懸濁した。室温下 800rpm で 5 分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いて添付の説明書に従い、全 RNA を抽出した。

得られた全 RNA $2 \mu\text{g}$ に対し、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとして逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。

(2) ヒト FcγRIIIa 蛋白質をコードする cDNA の取得

ヒト FcγRIIIa 蛋白質 (以下、hFcγRIIIa と表記する) の cDNA の取得は、以下のように行なった。

まず、hFcγRIIIa の cDNA の塩基配列[J. Exp. Med., 170, 481 (1989)] より、翻訳開始コドンを含む特異的なフォワードプライマー (配列番号 44 に示す) および翻訳終止コドンを含む特異的なリバースプライマー (配列番号 45 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 (1) で調製したヒト末梢血単核球由来の cDNA 溶液の 20 倍希釈液 $5 \mu\text{L}$ を含む $50 \mu\text{L}$ の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、 $1 \mu\text{M}$ 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 44 および 45)] を調製し、PCR を行った。PCR は、 94°C にて 30 秒間、 56°C にて 30 秒間、 72°C にて 60 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、35 サイクル行った。

PCR 後、該反応液を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、滅菌水 $20 \mu\text{L}$ に溶解した。制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、PCR 由来の約 800bp の断片を回収した。

一方、プラスミド pBluescriptII SK(-) $2.5 \mu\text{g}$ (Stratagene 社製) を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.9kbp の断片を回収した。

上記で得られたヒト末梢血単核球 cDNA 由来の約 800bp の断片とプラスミド pBluescriptII SK (-)由来の約 2.9kbp の断片を、DNA Ligation Kit Ver.2.0(宝酒造社製)を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α 株 (東洋紡績社製) を形質転換した。得られた形

質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサーABI PRISM 377 により各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を決定した。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、hFc γ R111a の cDNA の ORF 全長配列をコードすることを確認した。結果として 2 種類の hFc γ R111a をコードする cDNA を得た。一つは、配列番号 46 に示した配列であり、該配列を含むプラスミドとして pBSFc γ R111a5-3 を得た。配列番号 46 の塩基配列に対応するアミノ酸配列を配列番号 47 に示す。もう一つは、配列番号 48 に示した配列であり、該配列を含むプラスミドとして pBSFc γ R111a3 を得た。配列番号 48 の塩基配列に対応するアミノ酸配列を配列番号 49 に示す。配列番号 46 と配列番号 48 に示される塩基配列の違いは、538 番目の塩基がそれぞれ T と G であり、その結果、対応するアミノ酸配列は、配列上、176 番目がそれぞれ Phe と Val であった。以下、配列番号 47 に示されるアミノ酸配列の hFc γ R111a を hFc γ R111a(F)、配列番号 49 に示されるアミノ酸配列の hFc γ R111a を hFc γ R111a(V) と称す。

(3) 可溶性 hFc γ R111a(F) をコードする cDNA の取得

hFc γ R111a(F) の細胞外領域 (配列番号 47 の 1~193 番目) と C 末端に His-tag 配列を持つ可溶性 hFc γ R111a(F) [以下、shFc γ R111a(F) と表記する] をコードする cDNA を以下のようにして構築した。

まず、配列番号 46 に示される hFc γ R111a(F) の cDNA の塩基配列より、細胞外領域に特異的なプライマー Fc γ R3-1 (配列番号 50 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 (2) で作製したプラスミド pBSFc γ R111a5-3 をテンプレートとして含む反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、1 μ M プライマー Fc γ R3-1、1 μ M プライマー M13M4 (宝酒造社製)] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°C にて 30 秒間、56°C にて 30 秒間、72°C にて 60 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、35 サイクル行った。PCR 後、反応液を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、滅菌水 20 μ L に溶解した。制限酵素 PstI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約 110bp の特異的増幅断片を回収した。

一方、プラスミド pBSFc γ R111a5-3 を制限酵素 PstI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造

社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.5kbp の断片を回収した。

上記で得た hFc γ R111a(F) cDNA 由来の約 110bp の特異的増幅断片とプラスミド pBSFc γ R111a5-3 由来の約 3.5kbp の断片を、DNA Ligation Kit Ver.2.0(宝酒造社製)を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株(東洋紡績社製)を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調整し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シークエンサー377 により各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析し、pBSFc γ R111a(F)+His3 が得られたことを確認した。

決定した shFc γ R111a(F)の全長 cDNA 配列を配列番号 51、それに対応するシグナル配列を含むアミノ酸配列を配列番号 52 に示す。配列番号 52 において、N 末端メチオニンから 176 番目のアミノ酸残基はフェニルアラニンであった。

(4) 可溶性 hFc γ R111a(V)をコードする cDNA の取得

hFc γ R111a(V)の細胞外領域(配列番号 49 の 1~193 番目)と C 末端に His-tag 配列を持つ可溶性 hFc γ R111a(V)[以下、shFc γ R111a(V)と記す]をコードする cDNA を以下のようにして構築した。

本項(2)で得られたプラスミド pBSFc γ R111a3 を制限酵素 AlwNI (New England Biolabs 社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、hFc γ R111a(V)の 5'末端側を含む約 2.7kbp の断片を回収した。

本項(3)で得られたプラスミド pBSFc γ R111a(F)+His3 を制限酵素 AlwNI (New England Biolabs 社製)で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、hFc γ R111a の 3'末端側と His-tag 配列を含む約 920bp の断片を回収した。

上記で得たプラスミド pBSFc γ R111a3 由来の約 2.7kbp の断片とプラスミド pBSFc γ R111a(F)+His3 由来の約 920bp の断片を、DNA Ligation Kit Ver.2.0(宝酒造社製)により連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株(東洋紡績社製)を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調整し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シークエンサー377 により各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析し、pBSFc γ R111a+His2 が得られたことを確認した。

決定した shFcγRIIIa(F) の全長 cDNA 配列を配列番号 53、それに対応するシグナル配列を含むアミノ酸配列を配列番号 54 に示す。配列番号 54 において、N 末端メチオニンから 176 番目のアミノ酸残基はバリンであった。

(5) shFcγRIIIa(F) および shFcγRIIIa(V) の発現ベクターの構築

shFcγRIIIa(F) および shFcγRIIIa(V) の発現ベクターは、以下のようにして構築した。

本項 (3) および (4) で得られたプラスミド pBSFcγRIIIa+His3 および pBSFcγRIIIa+His2 のそれぞれを制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、それぞれ約 620bp の各断片を回収した。

一方、プラスミド pKANTEX93 を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約 10.7kbp の断片を回収した。

上記で得た shFcγRIIIa(F) cDNA および shFcγRIIIa(V) cDNA を含む約 620bp の各断片とプラスミド pKANTEX93 由来の約 10.7kbp の断片を、DNA Ligation Kit Ver.2.0 (宝酒造社製) を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5α 株 (東洋紡績社製) を形質転換した。得られた形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調整し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シークエンサー 377 により各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列を解析し、目的の shFcγRIIIa(F) cDNA を含む発現ベクター pKANTEXFcγRIIIa(F)-His および shFcγRIIIa(V) cDNA を含む発現ベクター pKANTEXFcγRIIIa(V)-His が得られたことを確認した。

2. shFcγRIIIa の安定生産細胞の作製

本参考例の第 1 項で構築した shFcγRIIIa の発現ベクター pKANTEXFcγRIIIa(F)-His および pKANTEXFcγRIIIa(V)-His をラットミエローマ YB2/0 細胞 [ATCC CRL-1662, J. Cell. Biol., 93, 576 (1982)] に導入し、二種類の shFcγRIIIa の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

制限酵素 AatII で消化し、線状化した pKANTEXFcγRIIIa-His の 10μg を 4×10⁶ 個の YB2/0 細胞へエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] で導入後、40mL の Hybridoma-SFM-FBS(10) [10%FBS を含む Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200μL/ウェルずつ分注した。5%

CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 1.0mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の shFcγRIIIa の発現量を後述する本参考例の第 5 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に shFcγRIIIa の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して shFcγRIIIa 生産量を増加させる目的で、G418 を 1.0mg/mL、DHFR の阻害剤である MTX (SIGMA 社製) を 50nM 含む Hybridoma-SFM-FBS(10)培地に $1\sim2\times10^5$ 細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2mL ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の shFcγRIIIa の発現量を本参考例の第 5 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に shFcγRIIIa の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 1.0mg/mL、MTX を 200nM の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS(10)培地で増殖可能かつ、shFcγRIIIa を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株に対して、2 回の限界希釈法によるクローン化を行った。shFcγRIIIa(F)を生産する形質転換細胞クローン KC1107 および shFcγRIIIa(V)を生産する形質転換細胞クローン KC1111 を得た。

4. shFcγRIIIa の精製

本参考例の第 2 項で得られた shFcγRIIIa(F)を生産する形質転換細胞クローン KC1107 および shFcγRIIIa(V)を生産する形質転換細胞クローン KC1111 を G418 を 1.0mg/mL、MTX を 200nmol/L で含む Hybridoma-SFM-GF(5) [5% Daigo's GF21 (和光純薬社製) を含む Hybridoma-SFM 培地 (LIFE TECHNOLOGIES 社製)] に 3×10^5 細胞/mL となるように懸濁し、182cm² フラスコ (Greiner 社製) に 50mL 分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 4 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Ni-NTA agarose (QIAGEN 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、shFcγRIIIa(F)および shFcγRIIIa(V)を精製した。

5. shFcγRIIIa(F)および shFcγRIIIa(V)の検出 (ELISA 法)

培養上清中あるいは精製した shFcγRIIIa(F)および shFcγRIIIa(V)の検出、定量は、以下に示す ELISA 法により行った。

His-tag に対するマウス抗体 Tetra-His Antibody (QIAGEN 社製) を PBS を用いて 5μg/mL

に調製した溶液を 96 ウェルの ELISA 用のプレート (Greiner 社製) に 50 μ L/ウェルで分注し、4°C、12 時間以上反応させた。反応後、1%BSA-PBS を 100 μ L/ウェルに加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清あるいは精製した shFc γ RIIIa(F)および shFc γ RIIIa(V)の各種希釈溶液を 50 μ L/ウェルに加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 50 倍に希釈したビオチン標識マウス抗ヒト CD16 抗体溶液 (PharMingen 社製)を 50 μ L/ウェルに加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識 Avidin D 溶液 (Vector 社製)を 50 μ L/ウェルに加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50 μ L/ウェルに加えて発色させ、5 分後に 5%SDS 溶液を 50 μ L/ウェルに加えて反応を停止させた。その後、OD415 を測定した。

配列表フリーテキスト

配列番号 17-人工配列の説明：一本鎖抗体のアミノ酸配列

配列番号 18-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 19-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 20-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 21-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 22-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 23-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 24-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 25-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 26-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 27-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 28-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 29-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 30-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 31-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 32-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 33-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 34-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 36-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 37-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 38-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 39-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 40-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 41-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 42-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 43-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 44-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 45-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 48-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 49-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 50-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 56-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 57-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 58-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 59-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 60-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 61-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 62-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 63-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 74-人工配列の説明：一本鎖抗体のアミノ酸配列
配列番号 75-人工配列の説明：二重特異性一本鎖抗体のアミノ酸配列
配列番号 76-人工配列の説明：二重特異性一本鎖抗体のアミノ酸配列
配列番号 77-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 78-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 79-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 81-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 82-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 83-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 84-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 85-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 86-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 87-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 88-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 89-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 90-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 91-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 92-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 93-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 94-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 95-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 96-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 97-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 98-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 99-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 100-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 101-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 102-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 103-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 104-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 105-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 106-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 107-人工配列の説明：合成 DNA

請求の範囲

1. 結合性蛋白質とN-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体Fc領域との融合蛋白質分子からなる医薬融合蛋白質組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である融合蛋白質組成物。
2. N-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合していない糖鎖である、請求の範囲1に記載の融合蛋白質組成物。
3. 抗体Fc領域がヒト抗体のIgGクラスである、請求の範囲1または2に記載の融合蛋白質組成物。
4. 抗体Fc領域がヒト抗体のIgG1クラスである、請求の範囲3に記載の融合蛋白質組成物。
5. 抗体融合蛋白質組成物が、ヒト抗体のIgG1クラス重鎖定常領域ドメイン2 (CH₂)を含む請求の範囲4に記載の融合蛋白質組成物。
6. 融合蛋白質組成物が、ヒト抗体ヒンジ領域、抗体のIgG1クラス重鎖定常領域ドメイン2 (CH₂) および抗体重鎖定常領域ドメイン3 (CH₃)を含む請求の範囲5に記載の融合蛋白質組成物。
7. 結合性蛋白質が、抗体の結合性断片、可溶性受容体およびリガンド蛋白質からなる群から選ばれる蛋白質を少なくとも1つ含む請求の範囲1～6のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物。
8. 抗体の結合性断片が、抗体重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) を含むポリペプチド鎖を少なくとも1つ含む請求の範囲7に記載の融合蛋白質組成物。
9. 抗体重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) を含むポリペプチド鎖が、一本鎖抗体である請求の範囲8に記載の融合蛋白質組成物。
10. 抗体の結合性断片が、一本鎖抗体である請求の範囲7に記載の融合蛋白質組成物。
11. 抗体の結合性断片が、二種類の抗体重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) を含むポリペプチド鎖を含む請求の範囲7に記載の融合蛋白質組成物。
12. 抗体重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) を含むポリペプチド鎖が、一本鎖抗体である請求の範囲11に記載の融合蛋白質組成物。

13. 抗体の結合性断片が、二重特異性一本鎖抗体である請求の範囲7に記載の融合蛋白質組成物。
14. 可溶性受容体が、可溶性 TNF (Tumor necrosis factor) 受容体 II である請求の範囲7に記載の融合蛋白質組成物。
15. 可溶性受容体が、配列番号 64 で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲15に記載の融合蛋白質組成物。
16. 融合蛋白質が、FERM BP-8499 により生産される請求の範囲14または15に記載の融合蛋白質組成物。
17. リガンド蛋白質が、LFA-3 (leukocyte Function Antigen-3) である請求の範囲7に記載の融合蛋白質組成物。
18. リガンド蛋白質が、配列番号 65 で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲16に記載の融合蛋白質組成物。
19. 融合蛋白質が、FERM BP-8500 により生産される請求の範囲17または18に記載の融合蛋白質組成物。
20. 融合蛋白質組成物が、2量体である請求の範囲1～19のいずれか1項に記載の融合蛋白質組成物。
21. 請求の範囲1～20のいずれか1項に記載の融合蛋白質をコードする DNA を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。
22. 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素を失活するようにゲノムが改変された細胞である、請求の範囲21に記載の形質転換体。
23. 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素、または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞である、請求の範囲22に記載の形質転換体。
24. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD) および GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx)

からなる群から選ばれる酵素である、請求の範囲 2 2 または 2 3 に記載の形質転換体。

2 5. GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a) または (b) から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 2 4 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

2 6. GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 2 4 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質。

2 7. GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a) または (b) から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 2 4 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

2 8. GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a) ~ (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 2 4 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

29. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α 1,6-フコシルトランスフェラーゼである請求の範囲22または23に記載の形質転換体。

30. α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)~(d)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、請求の範囲29に記載の形質転換体。

- (a) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNA；
- (c) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；
- (d) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

31. α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)~(f)からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲29に記載の形質転換体。

- (a) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (c) 配列番号7で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (d) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (e) 配列番号7で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (f) 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

32. 宿主細胞が、下記の(a)~(h)からなる群から選ばれる細胞である請求の範囲21~31のいずれか1項に記載の形質転換体。

- (a) チャイニーズハムスター卵巢組織由来CHO細胞；

- (b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞；
- (c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (f) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (g) 胚性幹細胞；
- (h) 受精卵細胞。

33. 形質転換体が FERM BP-8499 である請求の範囲 21～32 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

34. 形質転換体が FERM BP-8500 である請求の範囲 21～32 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

35. 請求の範囲 21～34 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該抗体組成物を採取し、精製する、請求の範囲 1～20 のいずれか 1 項に記載の融合蛋白質組成物の製造方法。

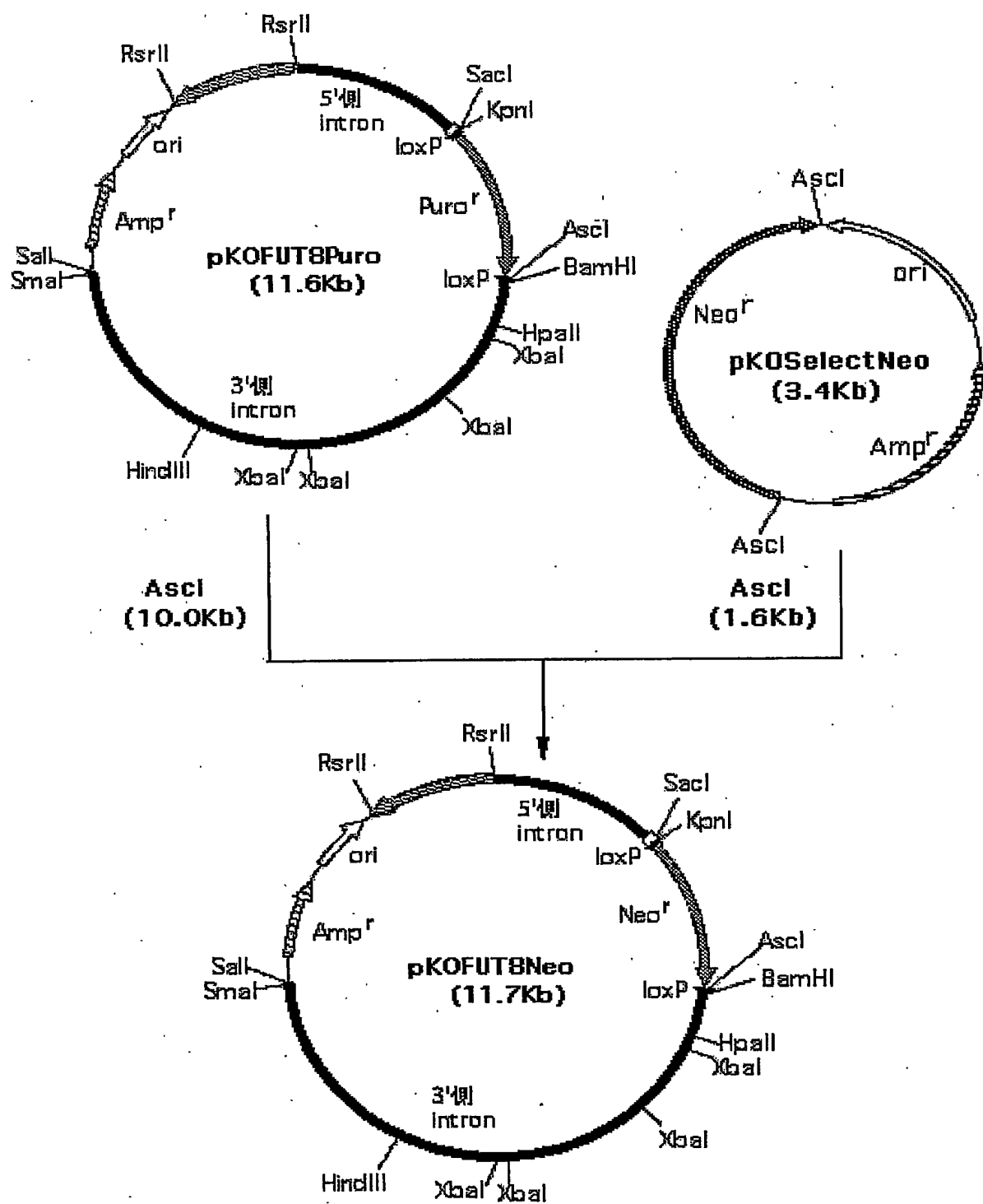
36. 請求の範囲 35 に記載の製造方法により得られる、請求の範囲 1～20 のいずれか 1 項に記載の抗体融合蛋白質組成物。

37. 請求の範囲 1～20 および 36 のいずれか 1 項に記載の融合蛋白質組成物を有効成分として含有する医薬。

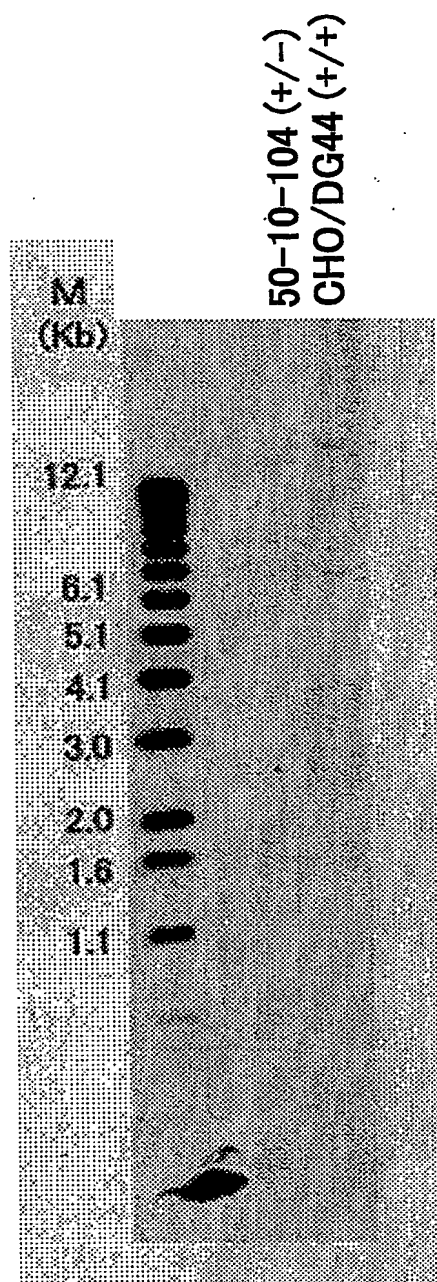
38. 請求の範囲 1～20 および 36 のいずれか 1 項に記載の融合蛋白質組成物を有効成分として含有する医薬が、腫瘍、炎症性疾患または自己免疫疾患の予防薬または治療薬。

39. 腫瘍が、血液腫瘍または癌である請求の範囲 38 に記載の疾患の予防薬または治療薬。

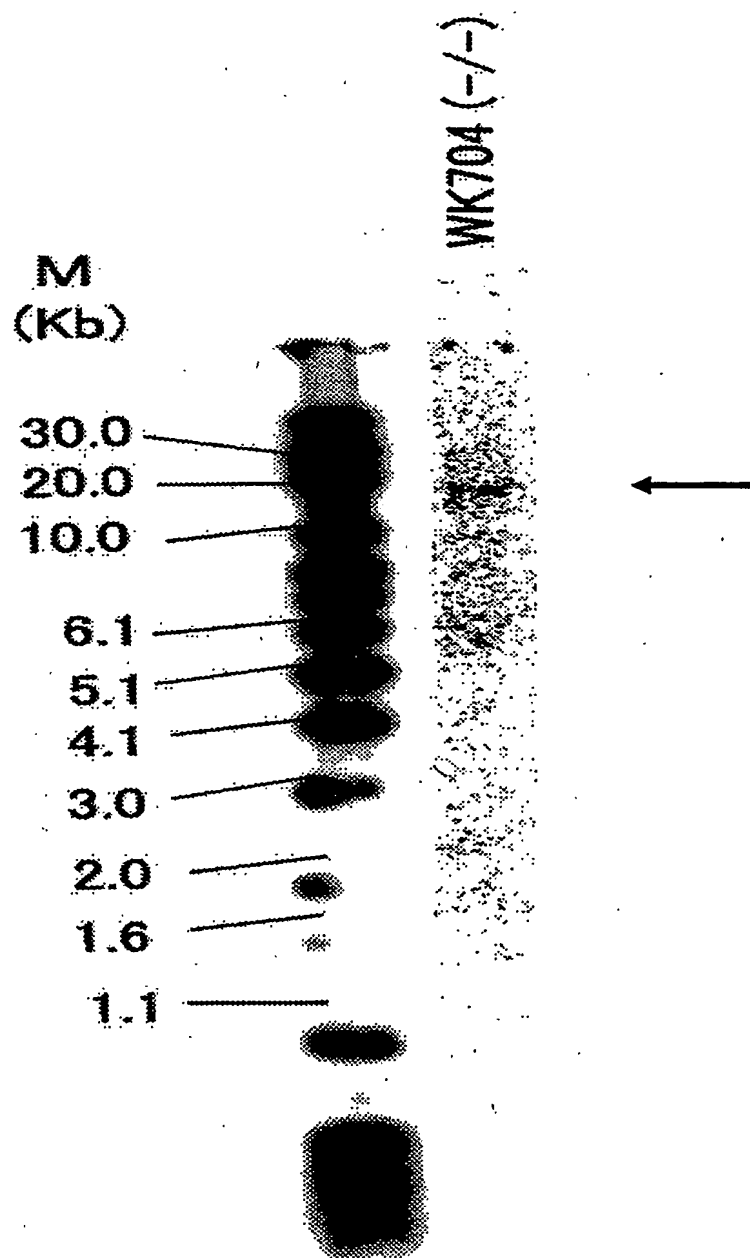
第1図



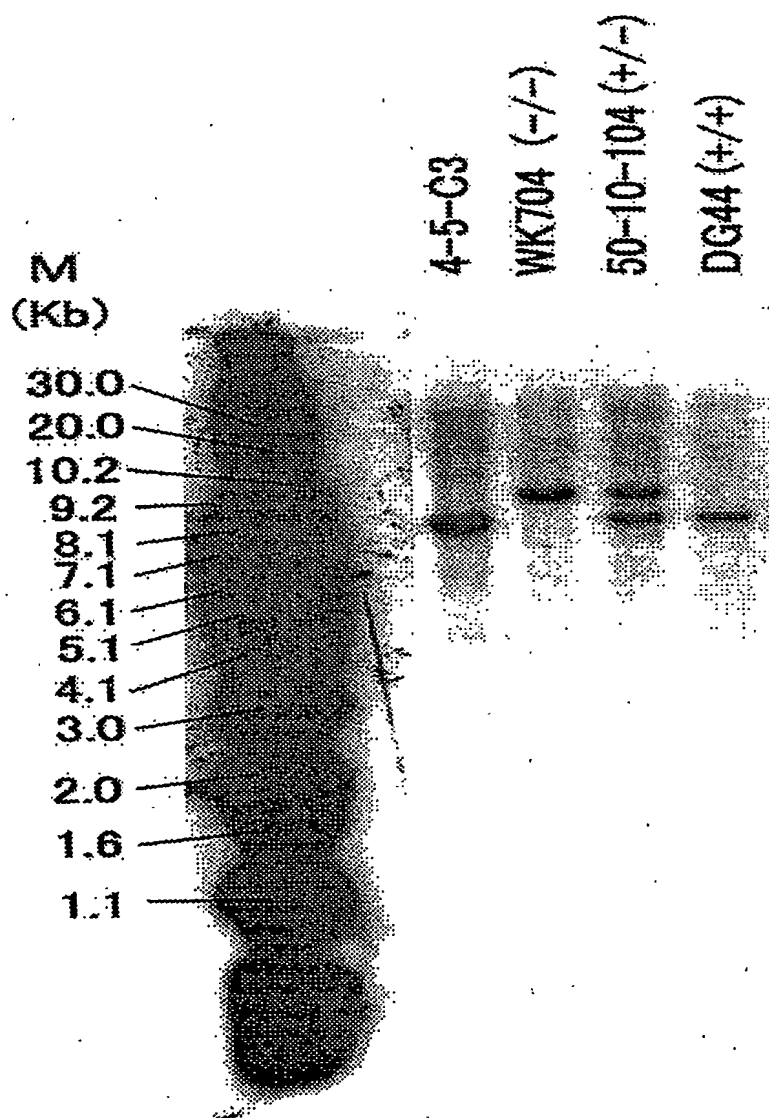
第2図



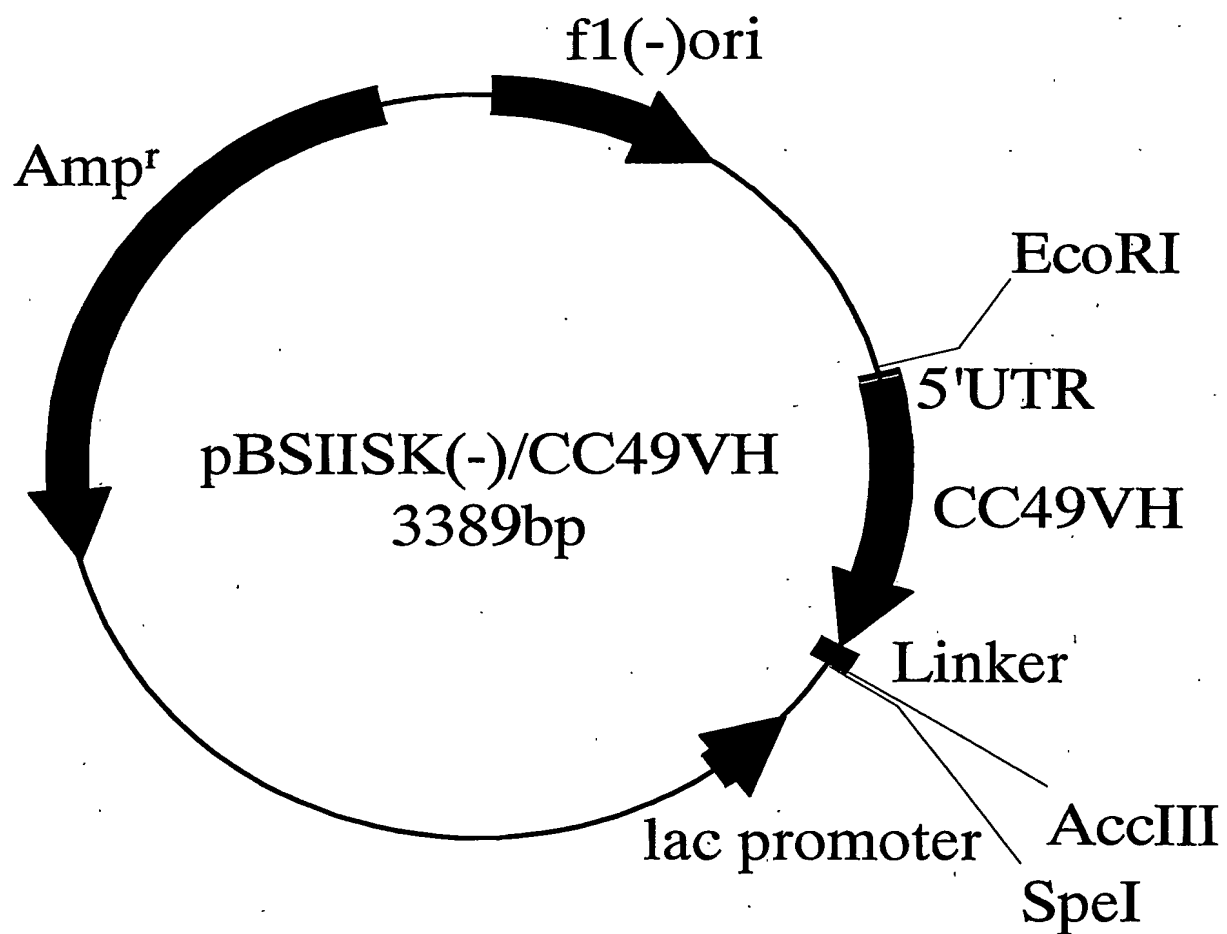
第3図



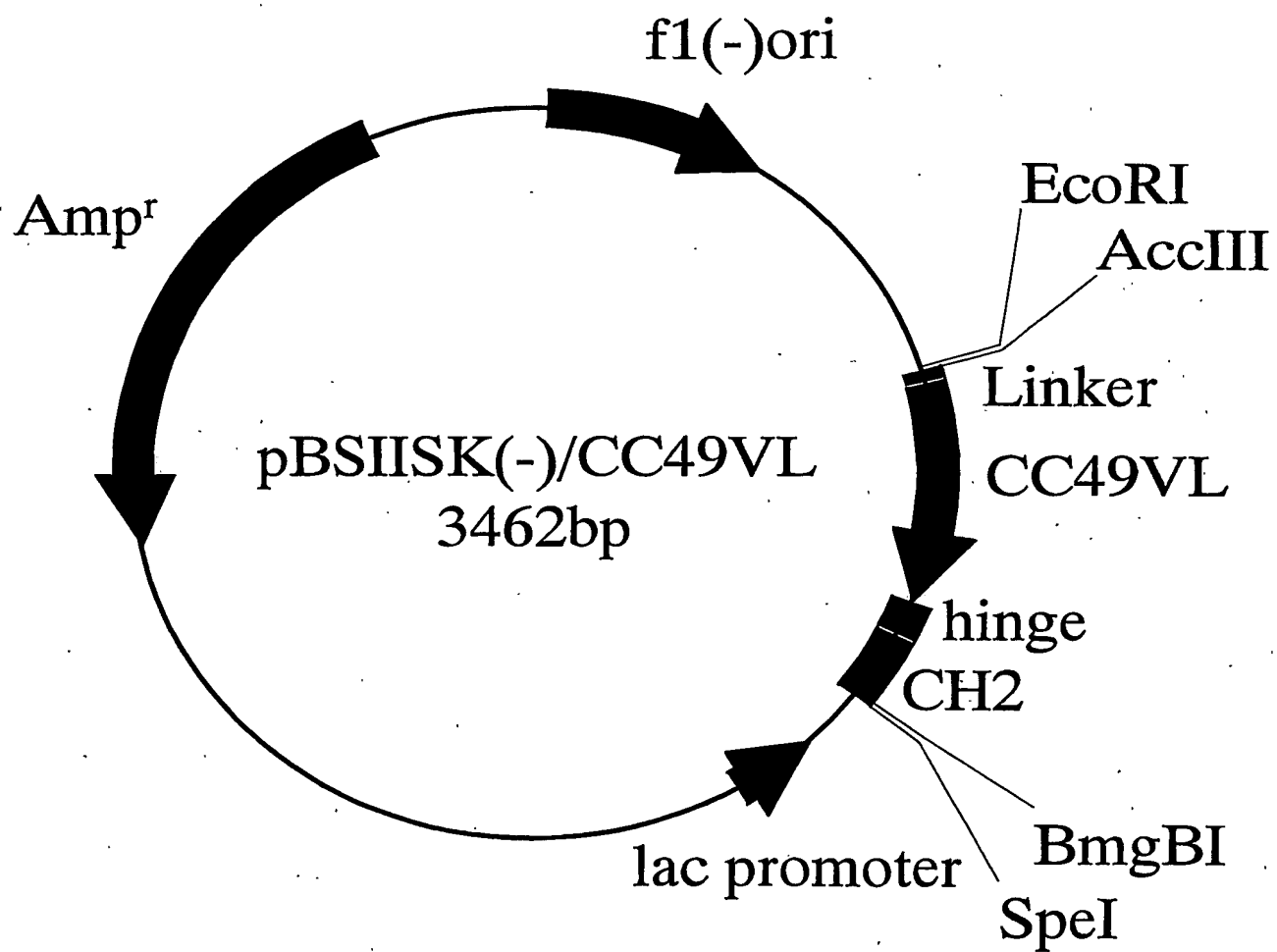
第4図



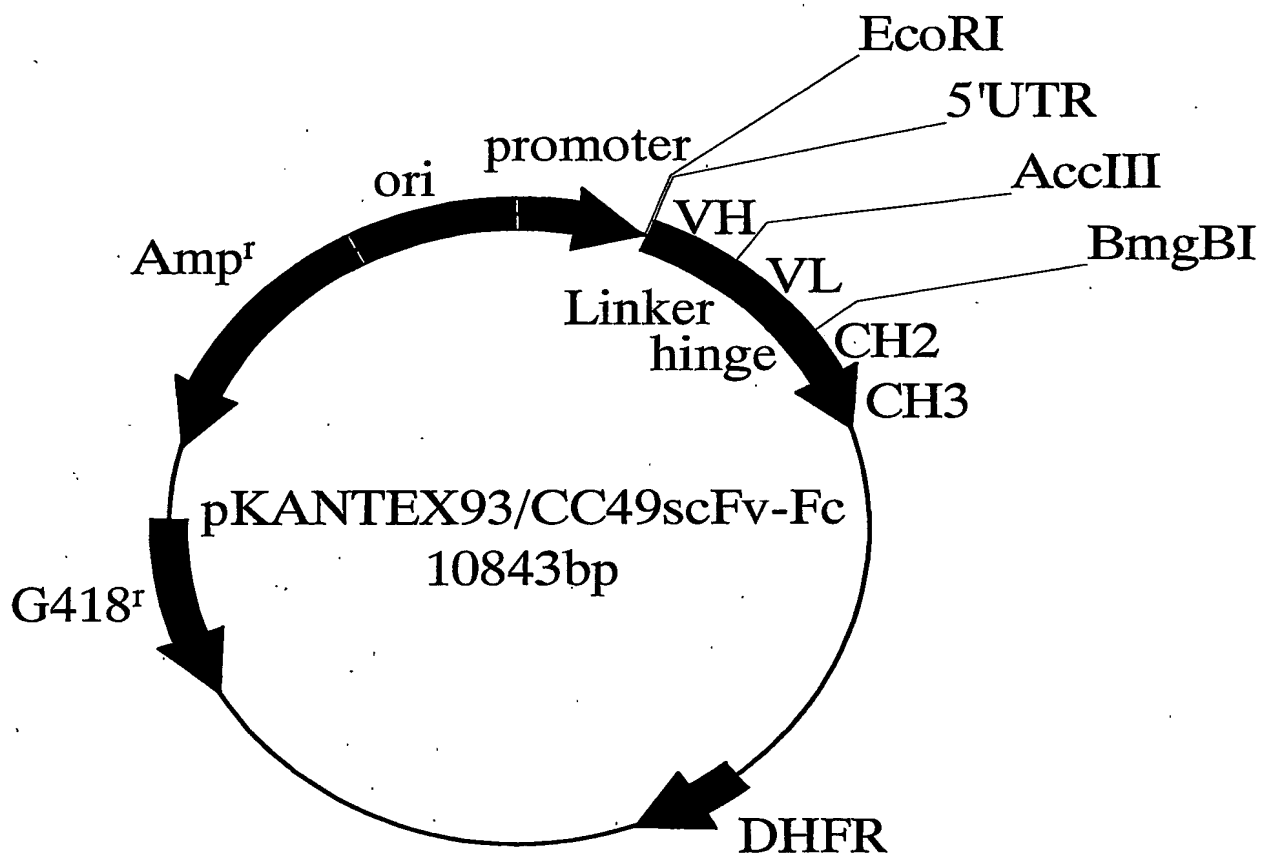
第5図



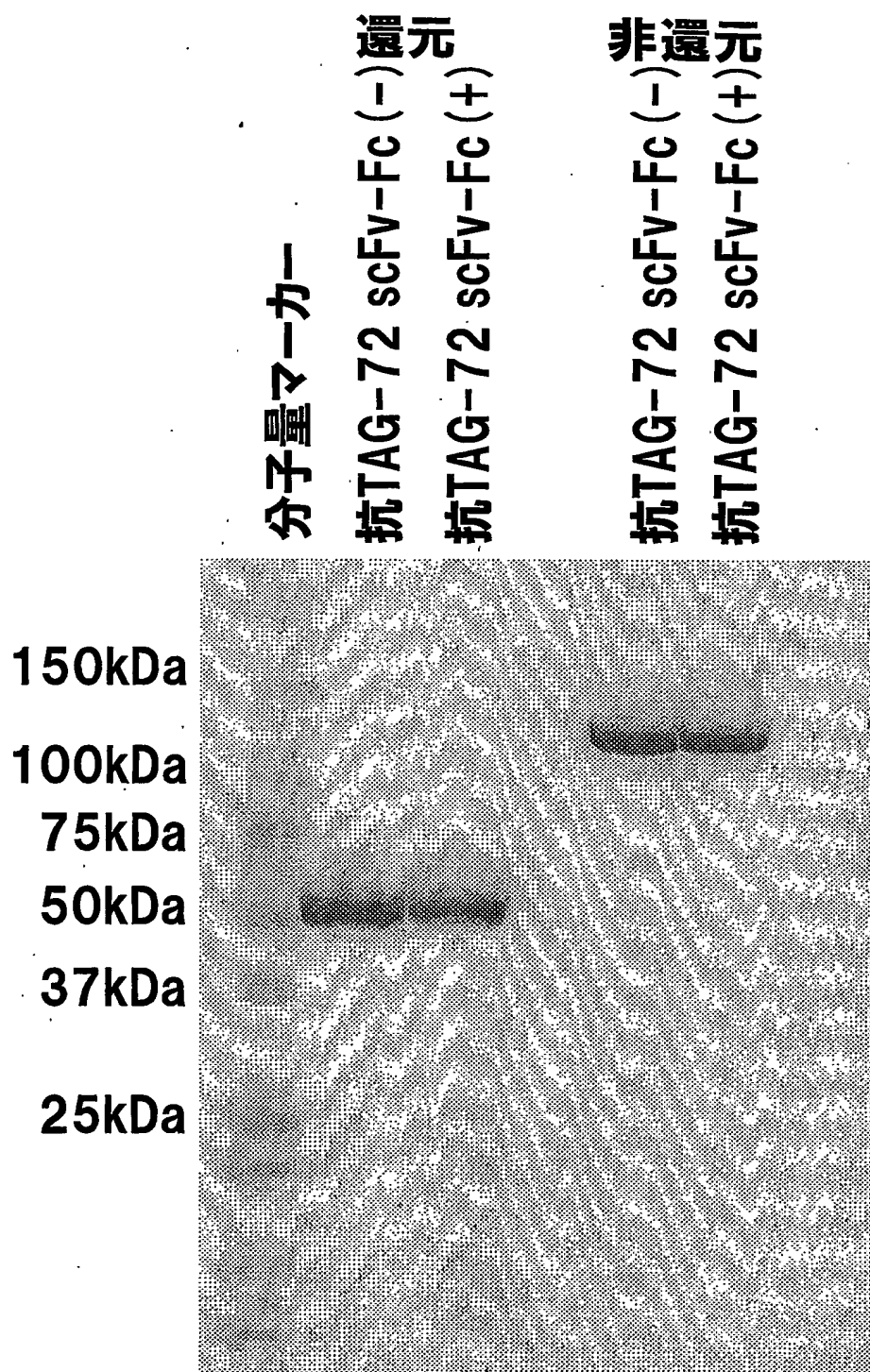
第6図



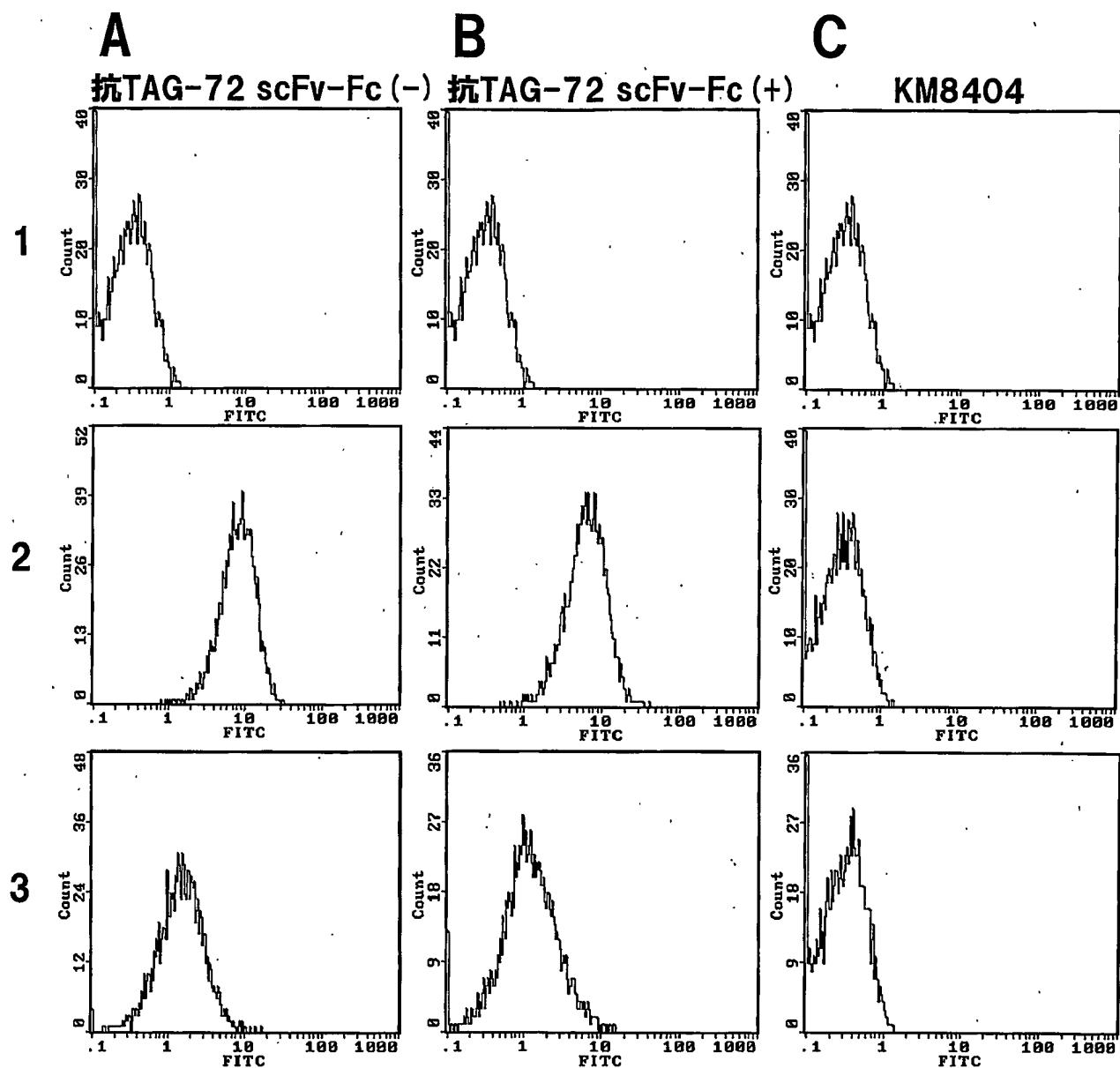
第7図



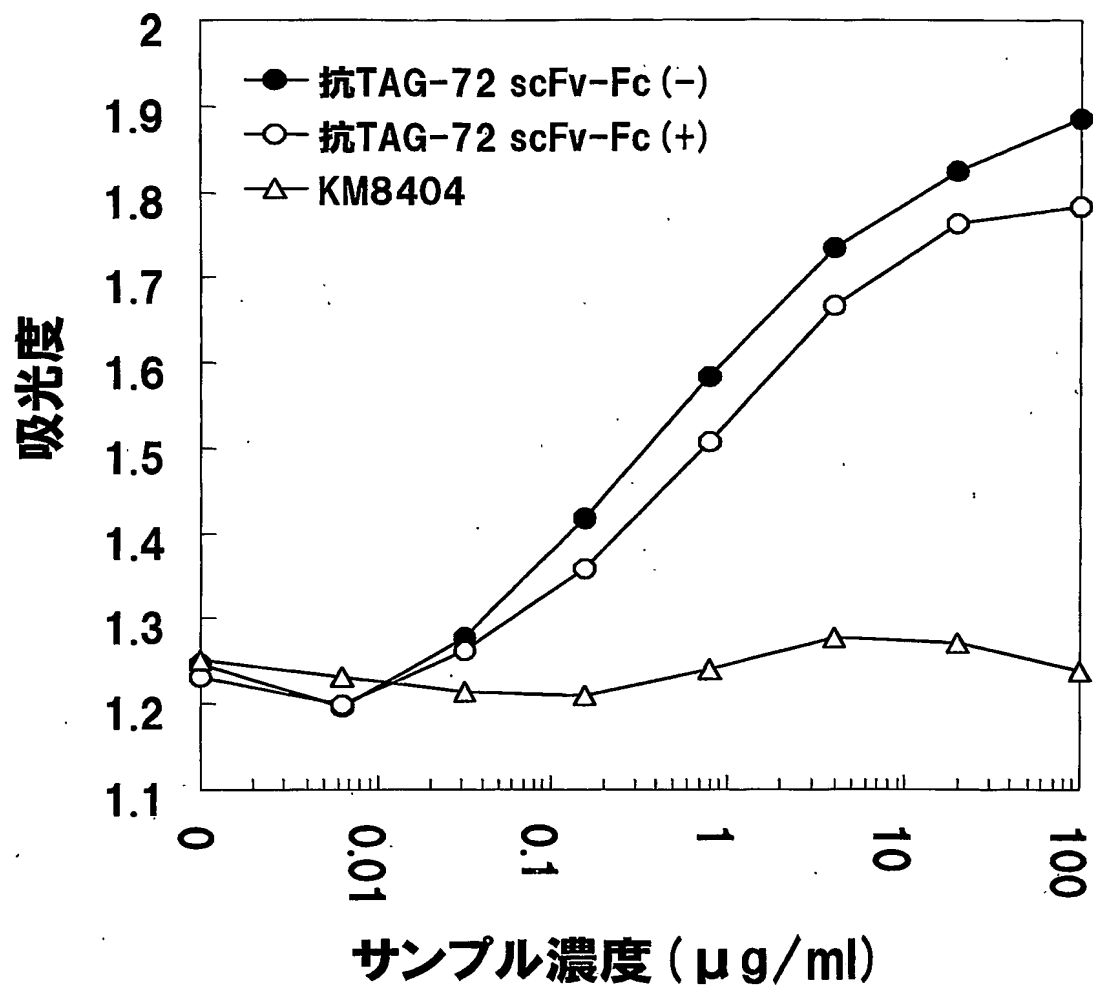
第8図



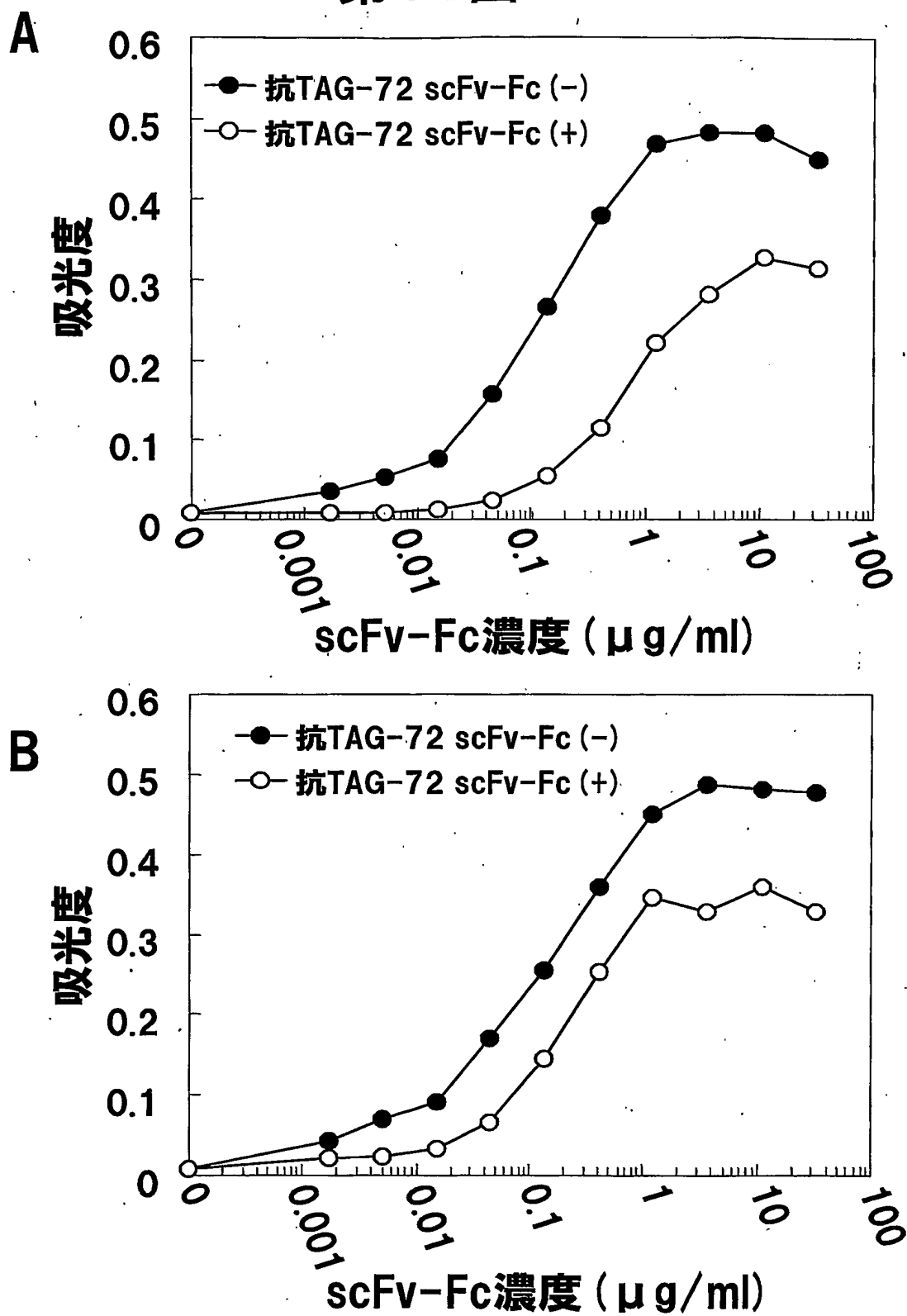
第9図



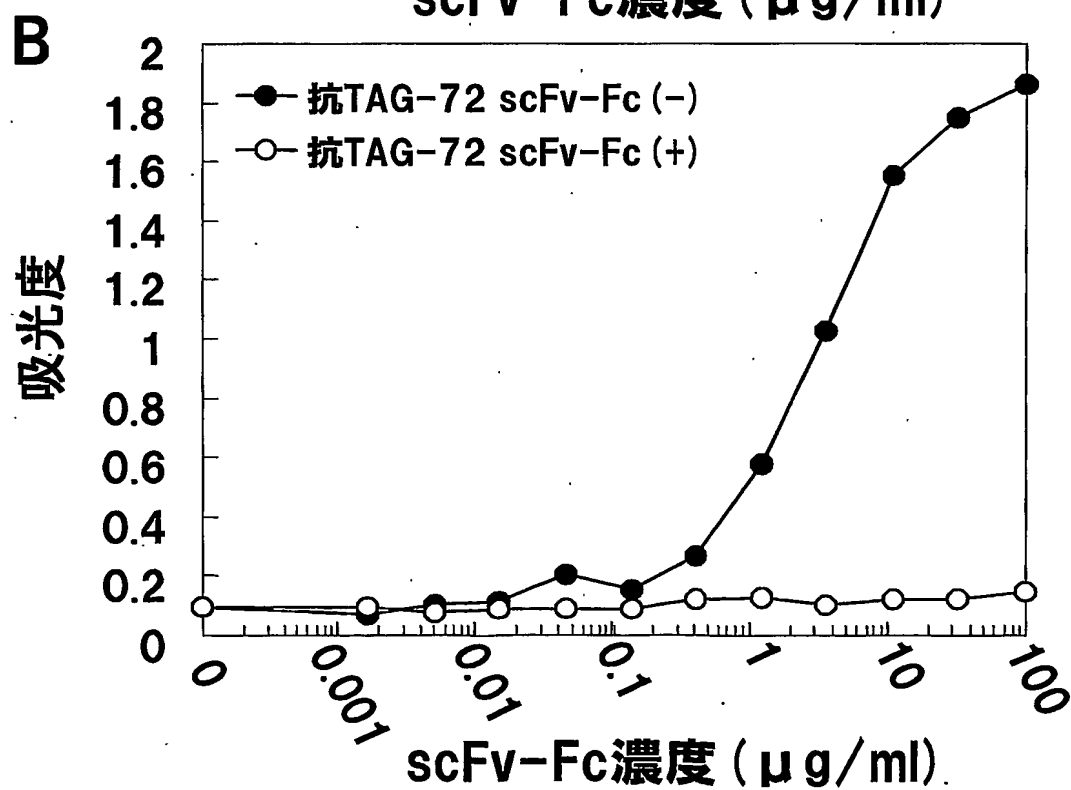
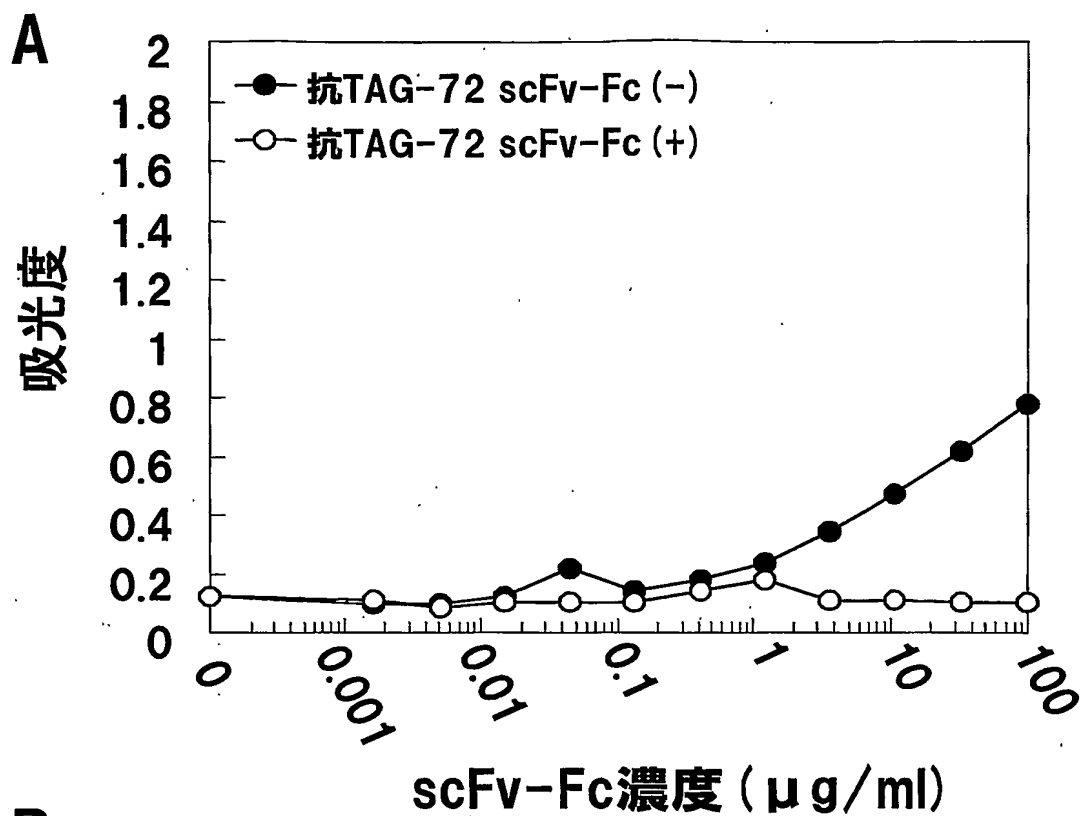
第10図



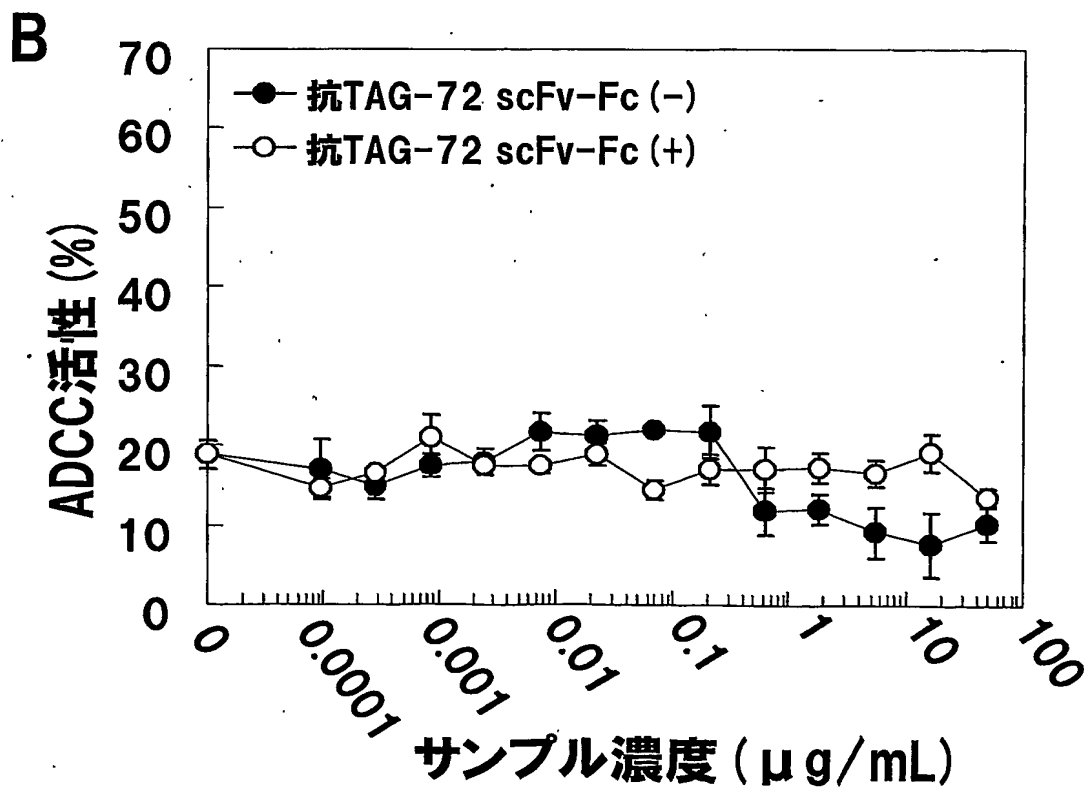
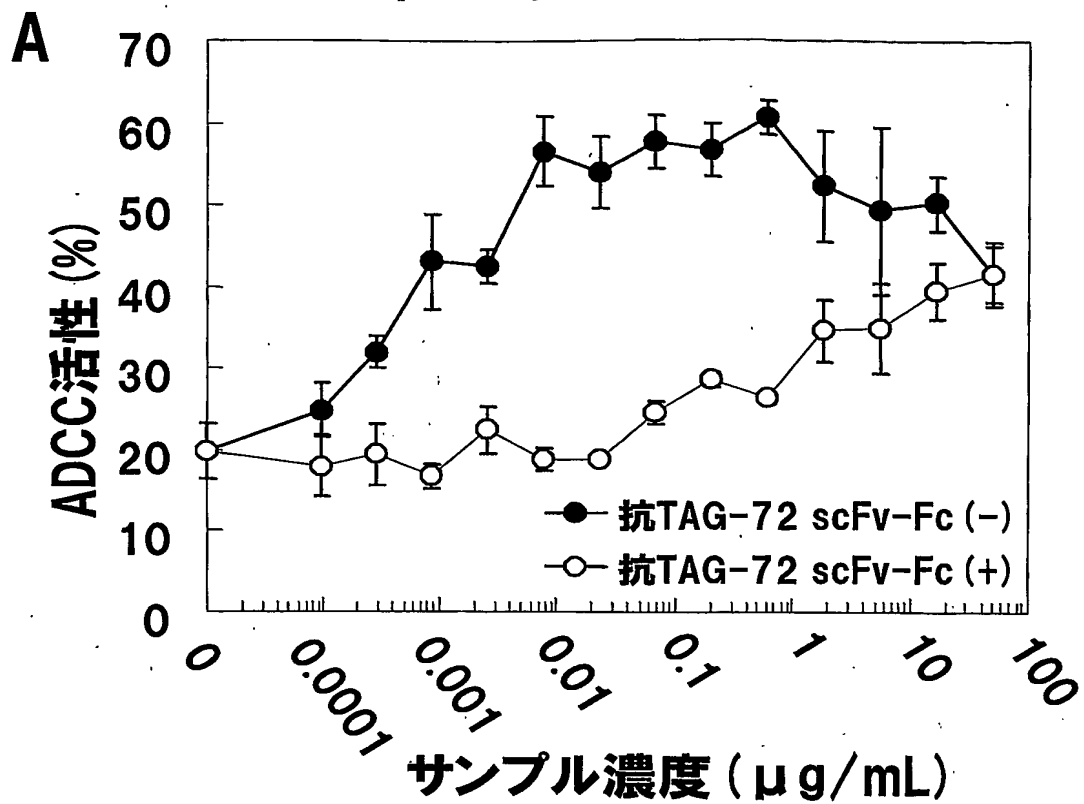
第11図



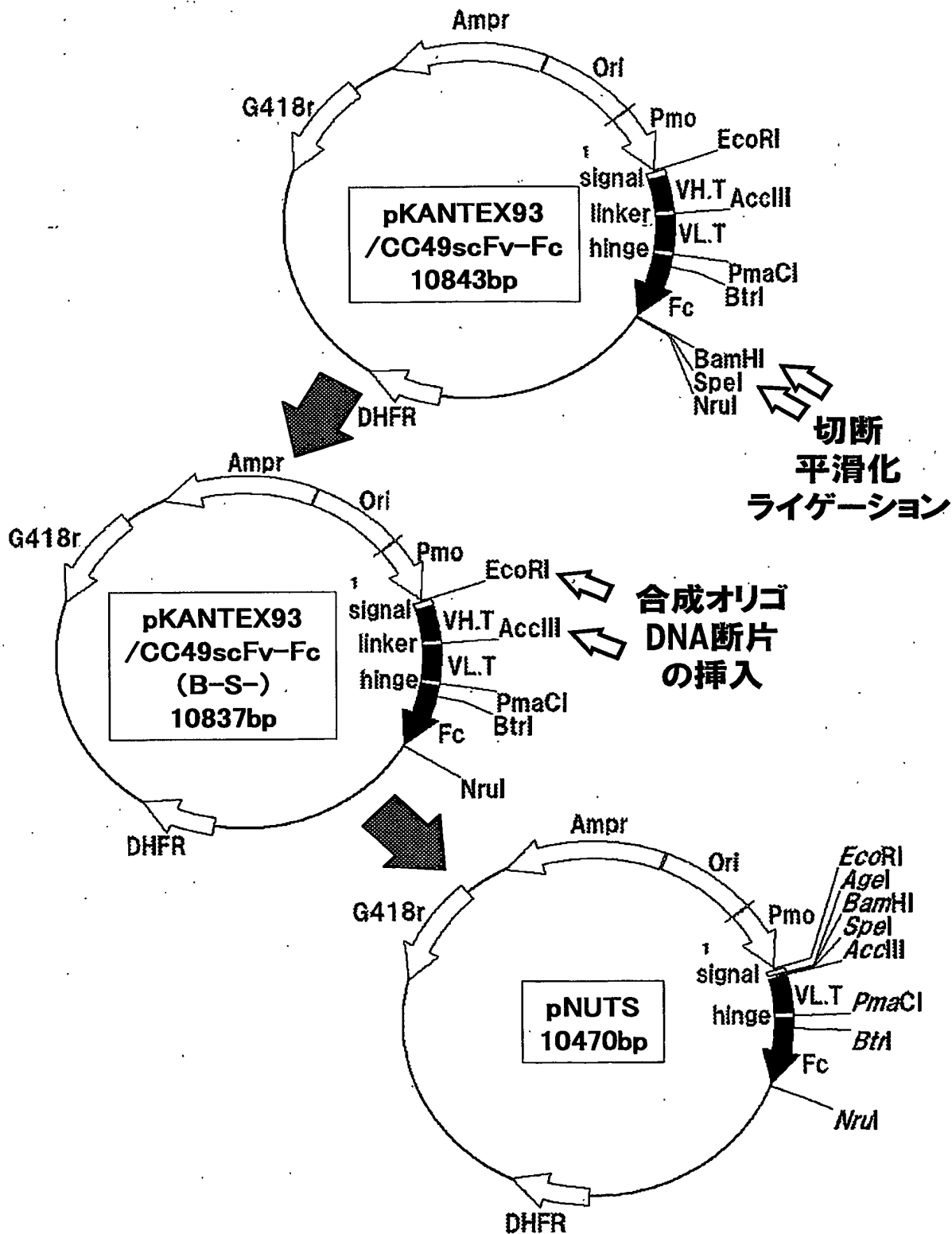
第12図



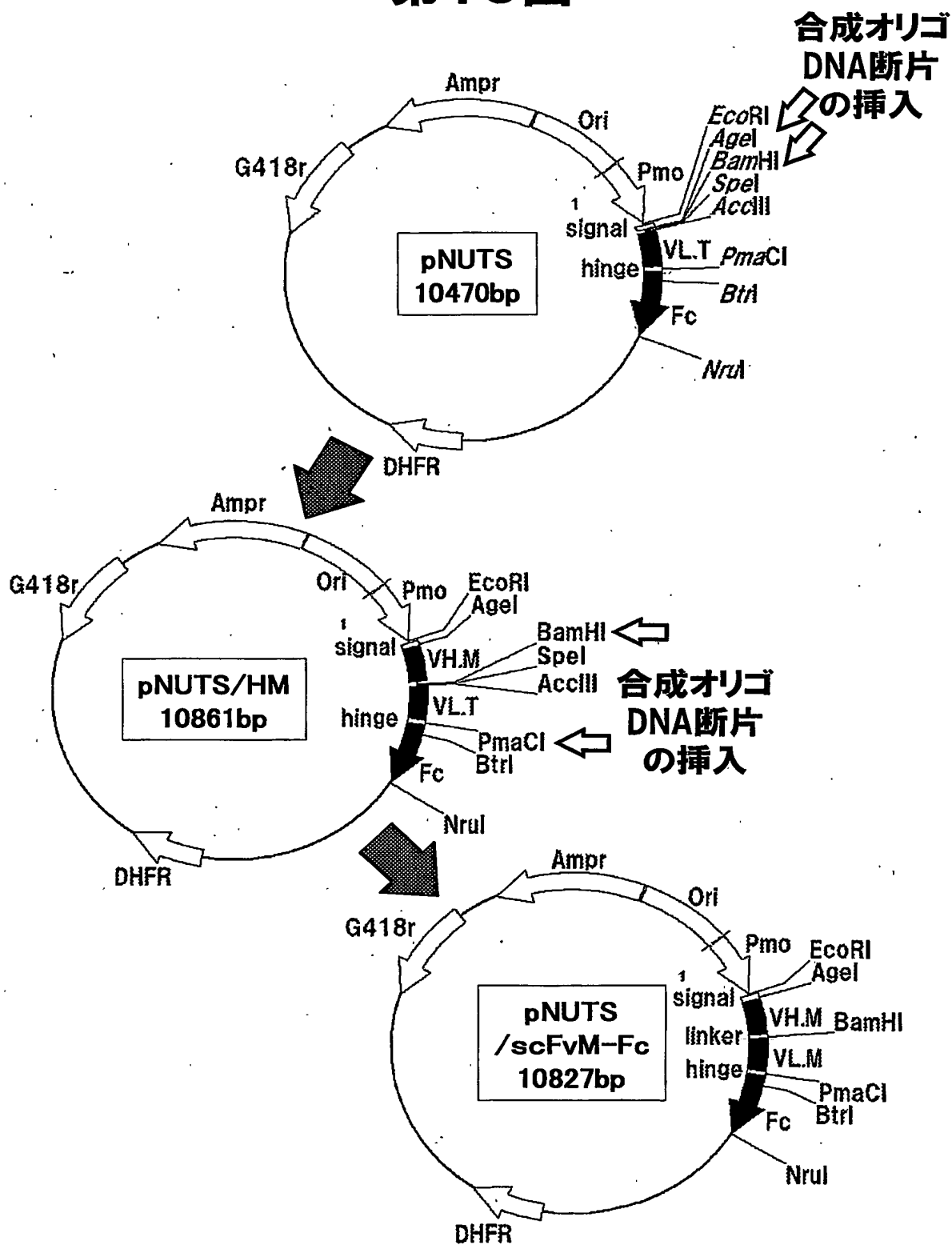
第13図

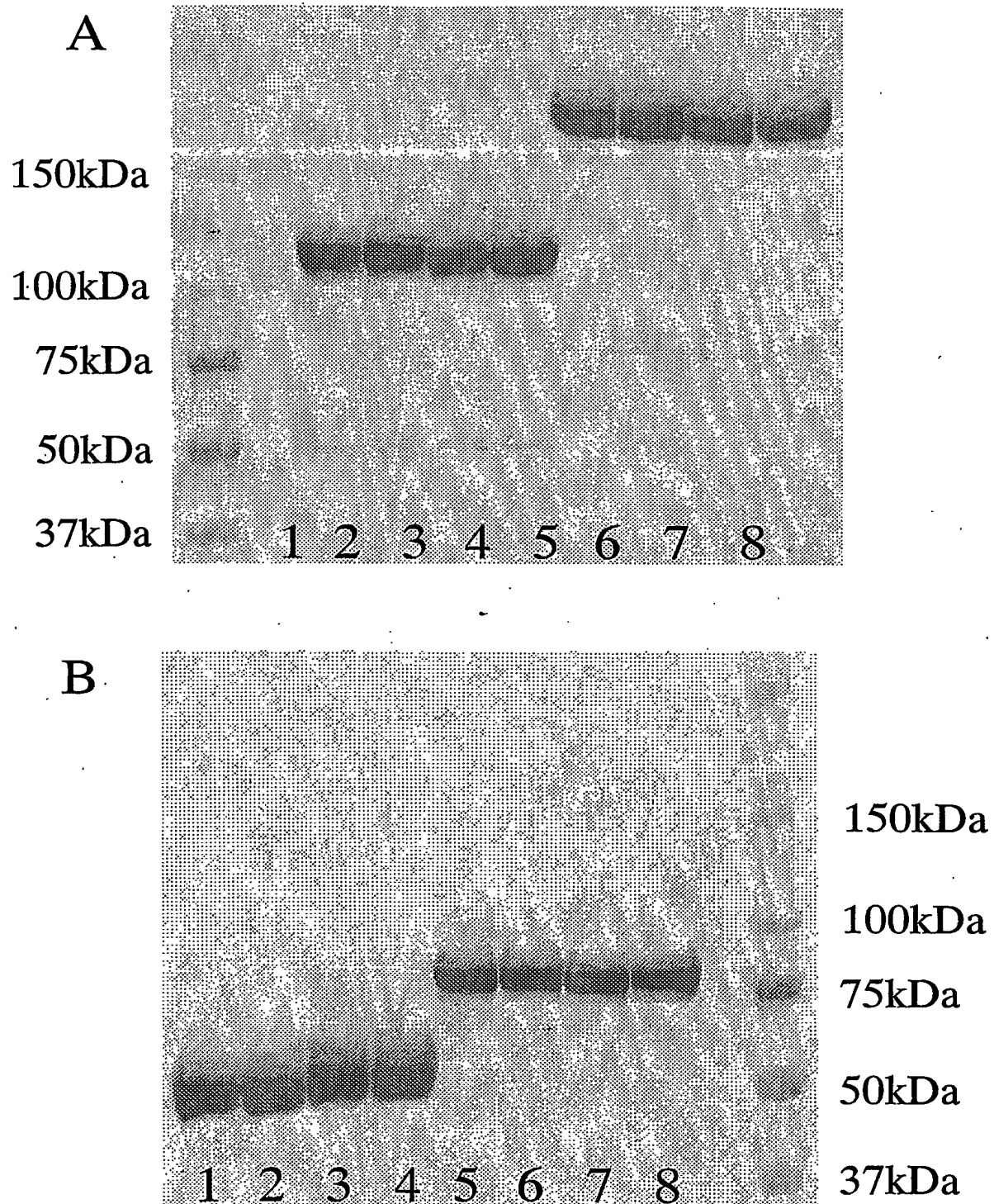


第14図

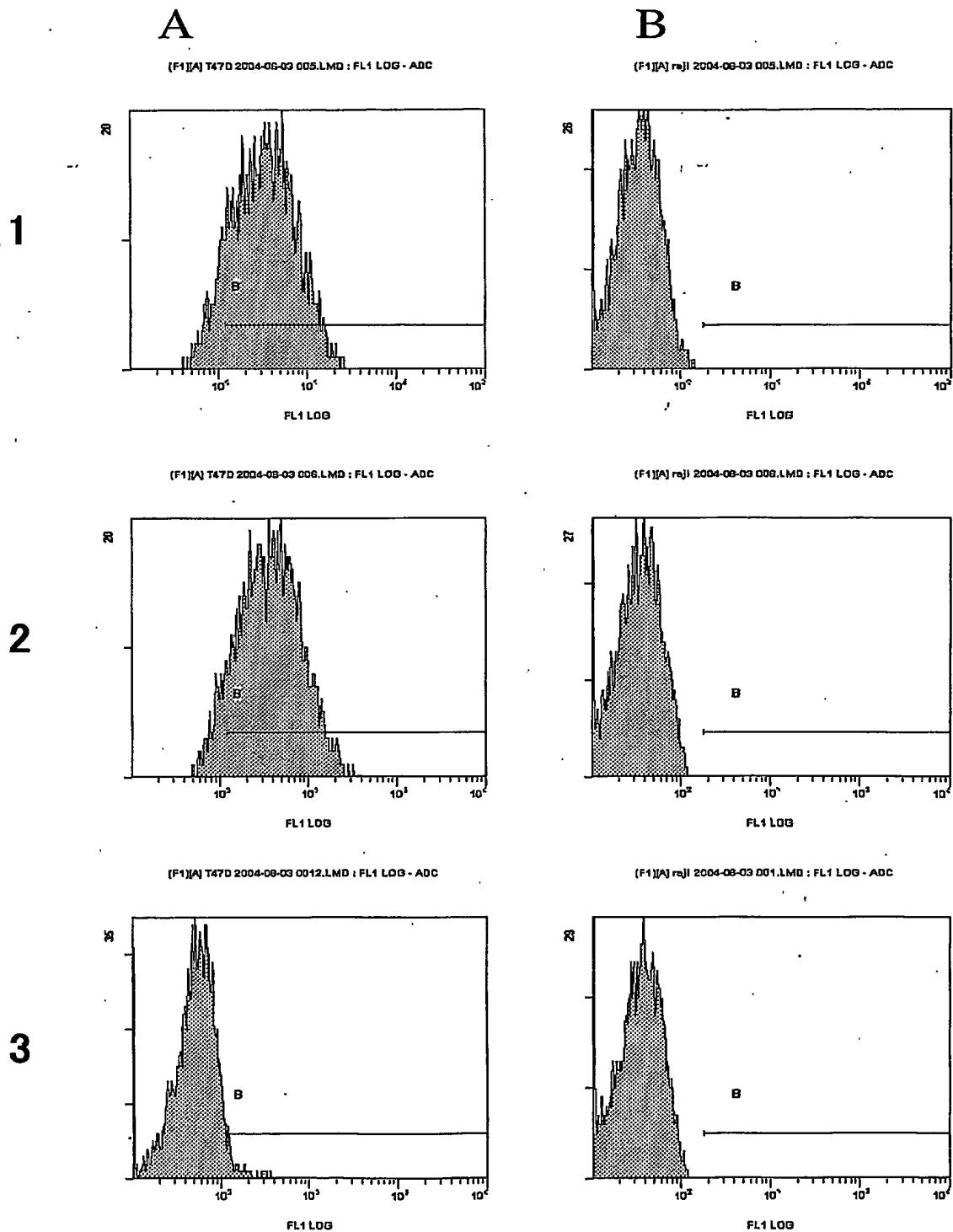


第15図

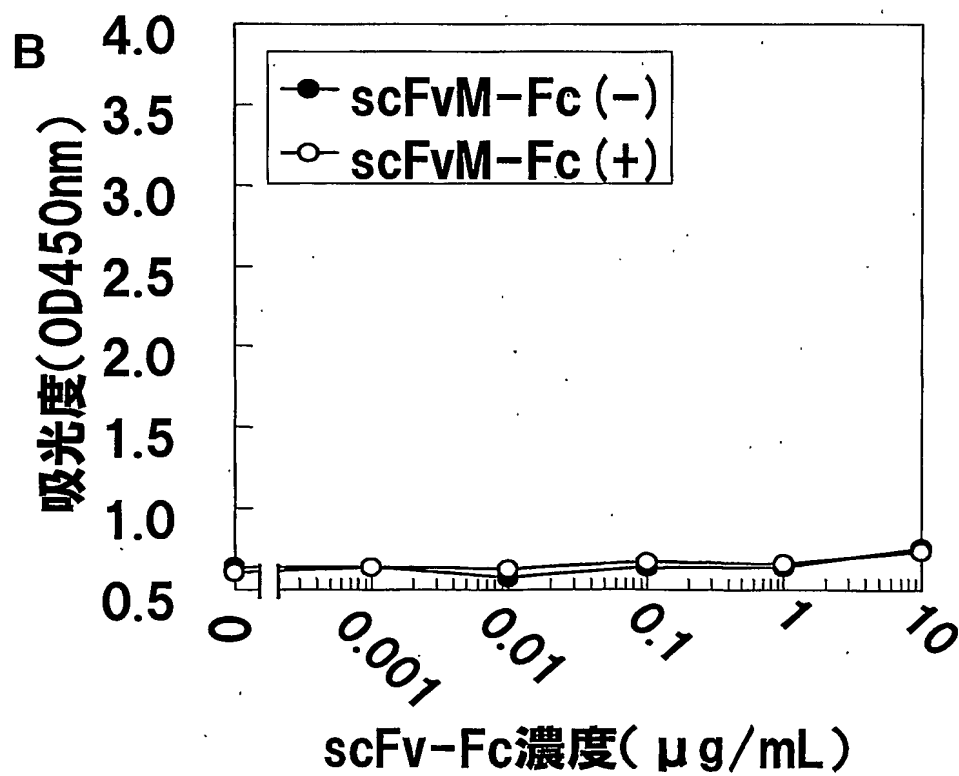
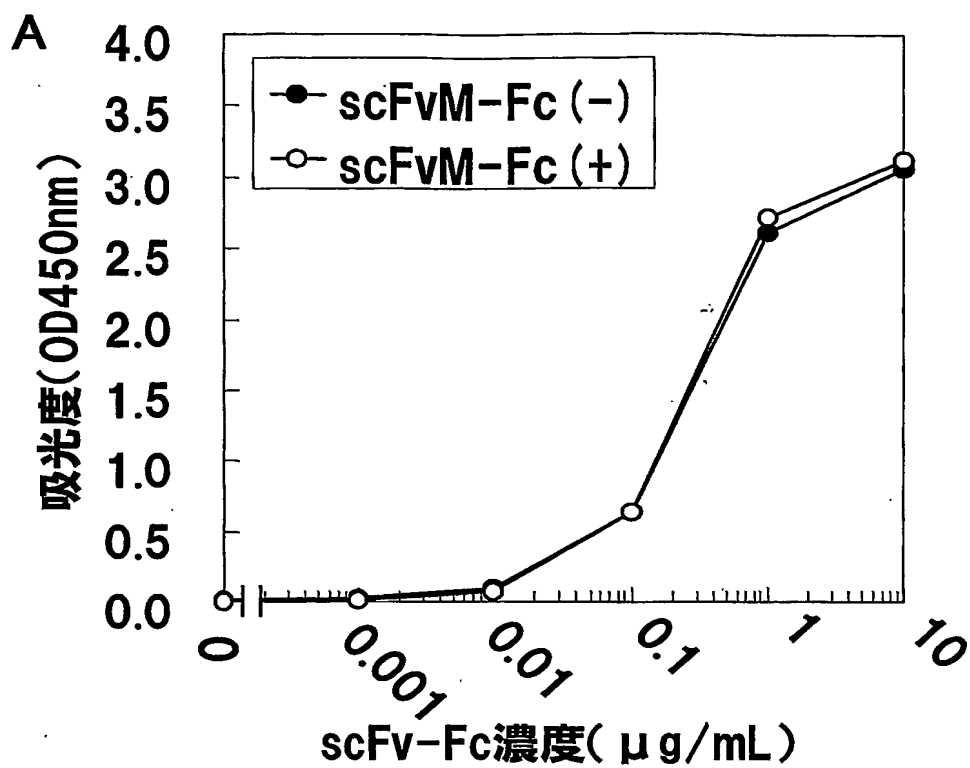


第16図

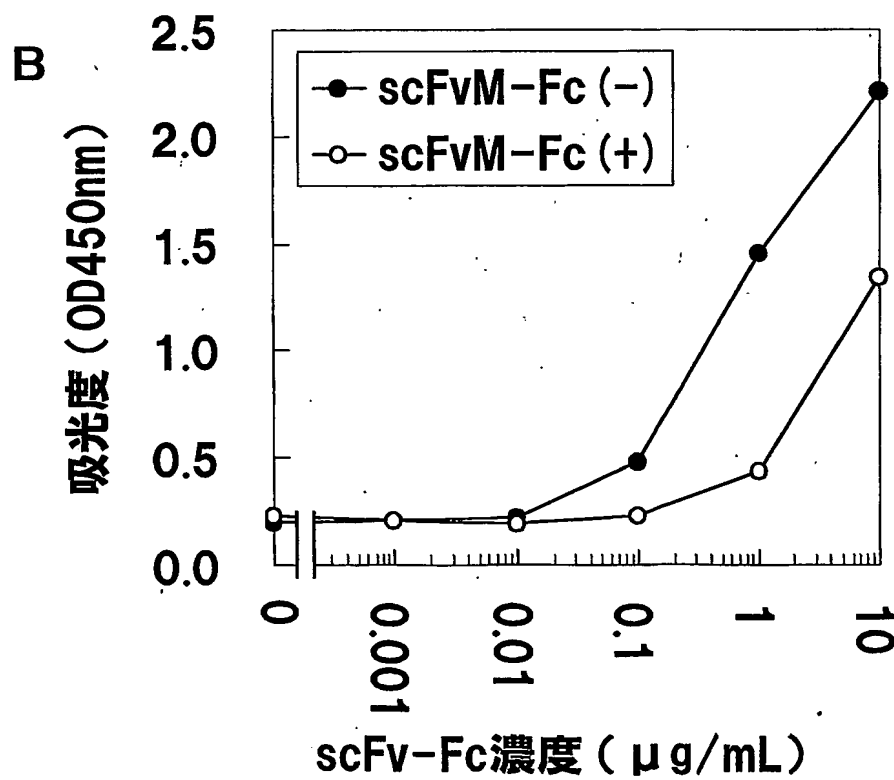
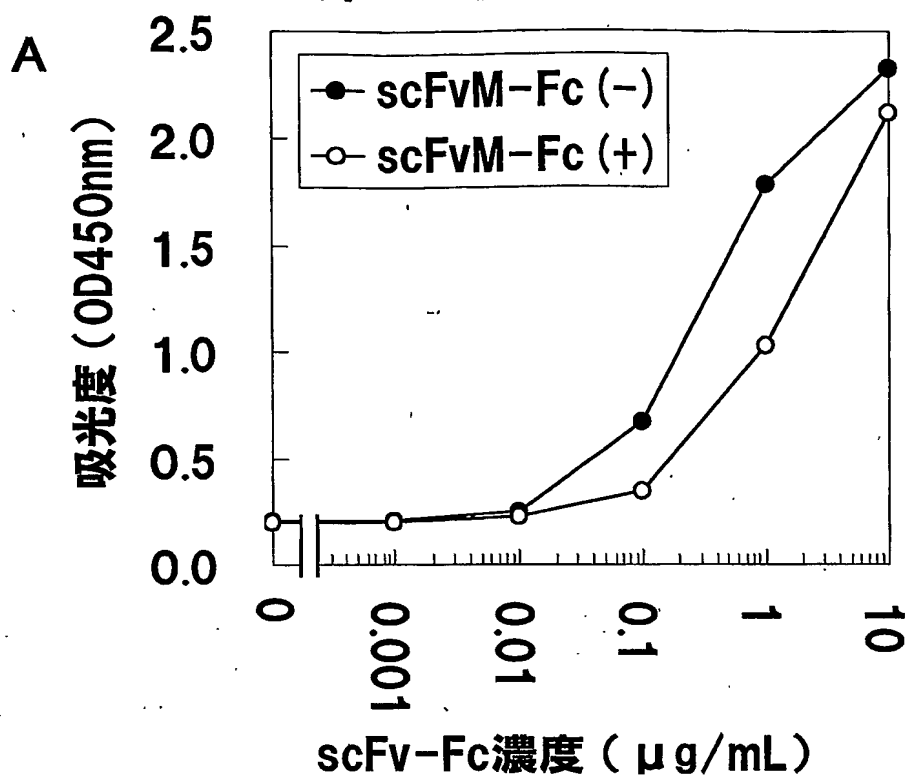
第17図



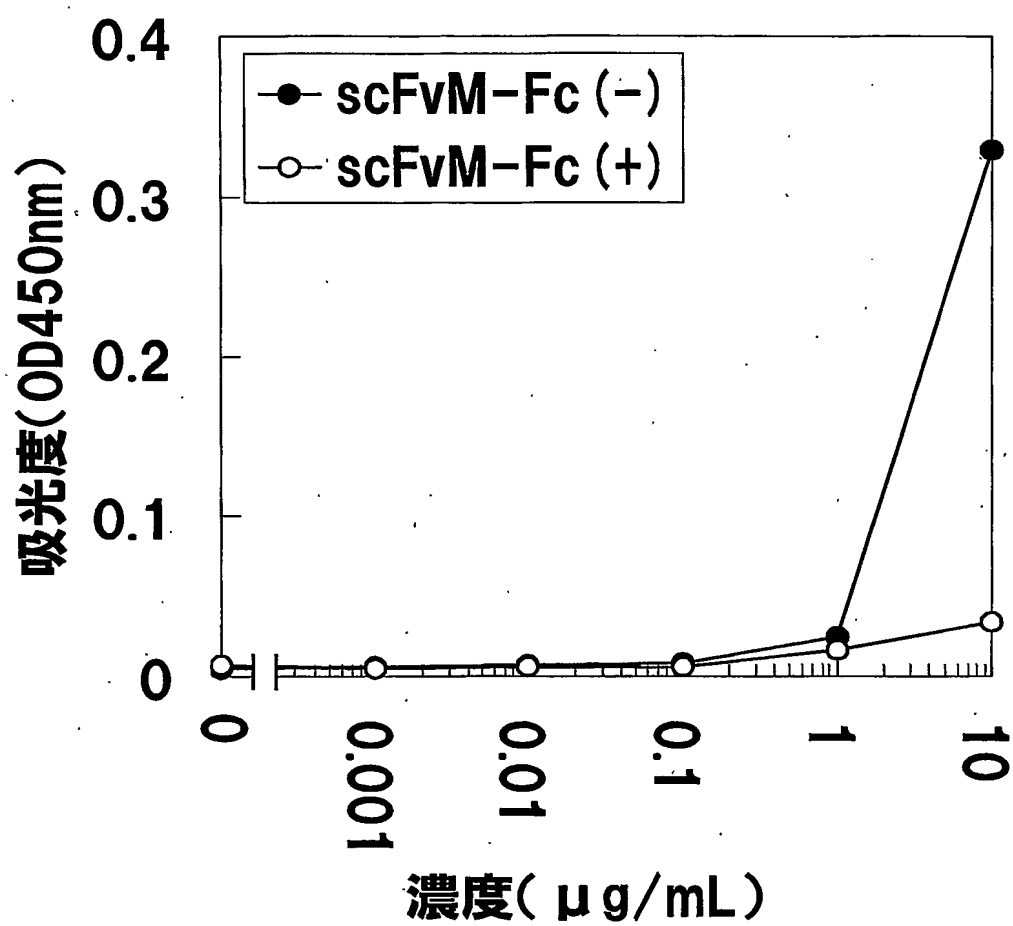
第18図



第19図

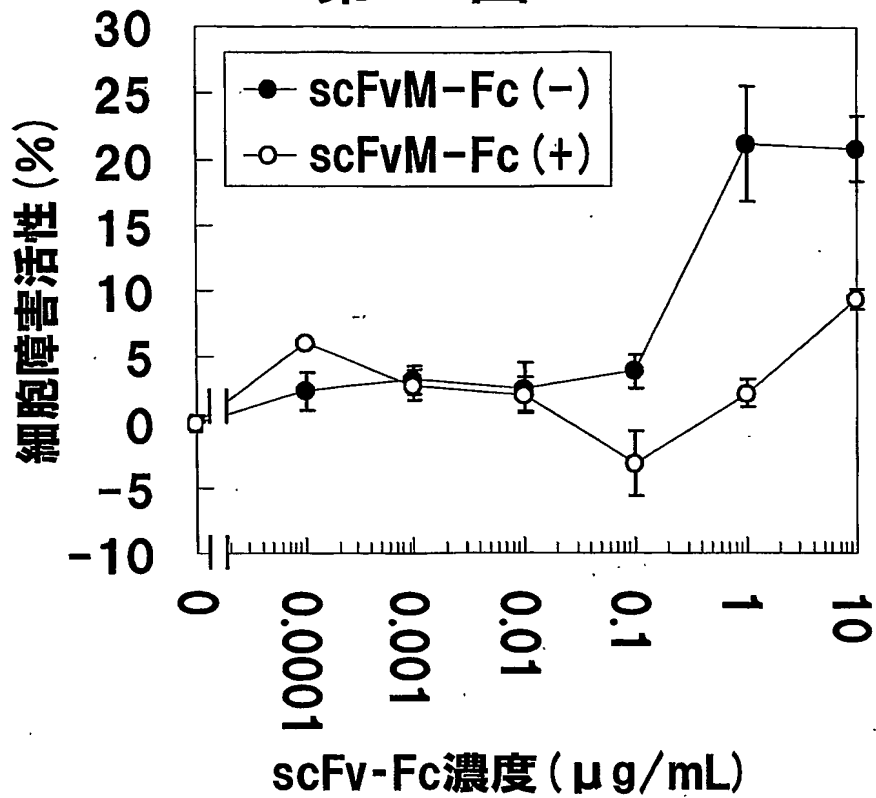


第20図

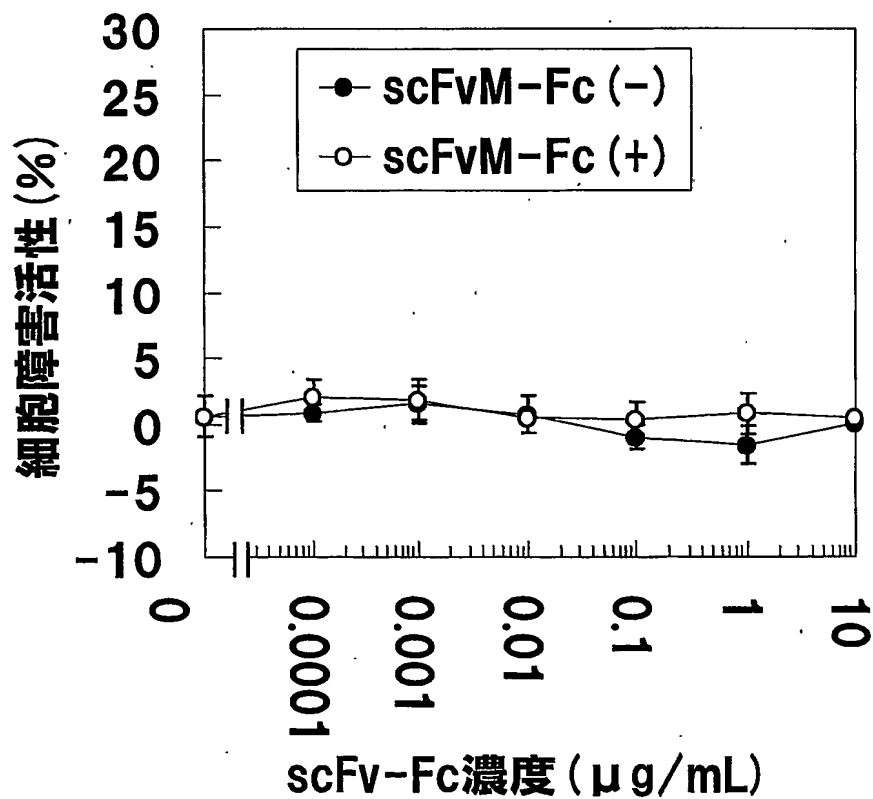


第21図

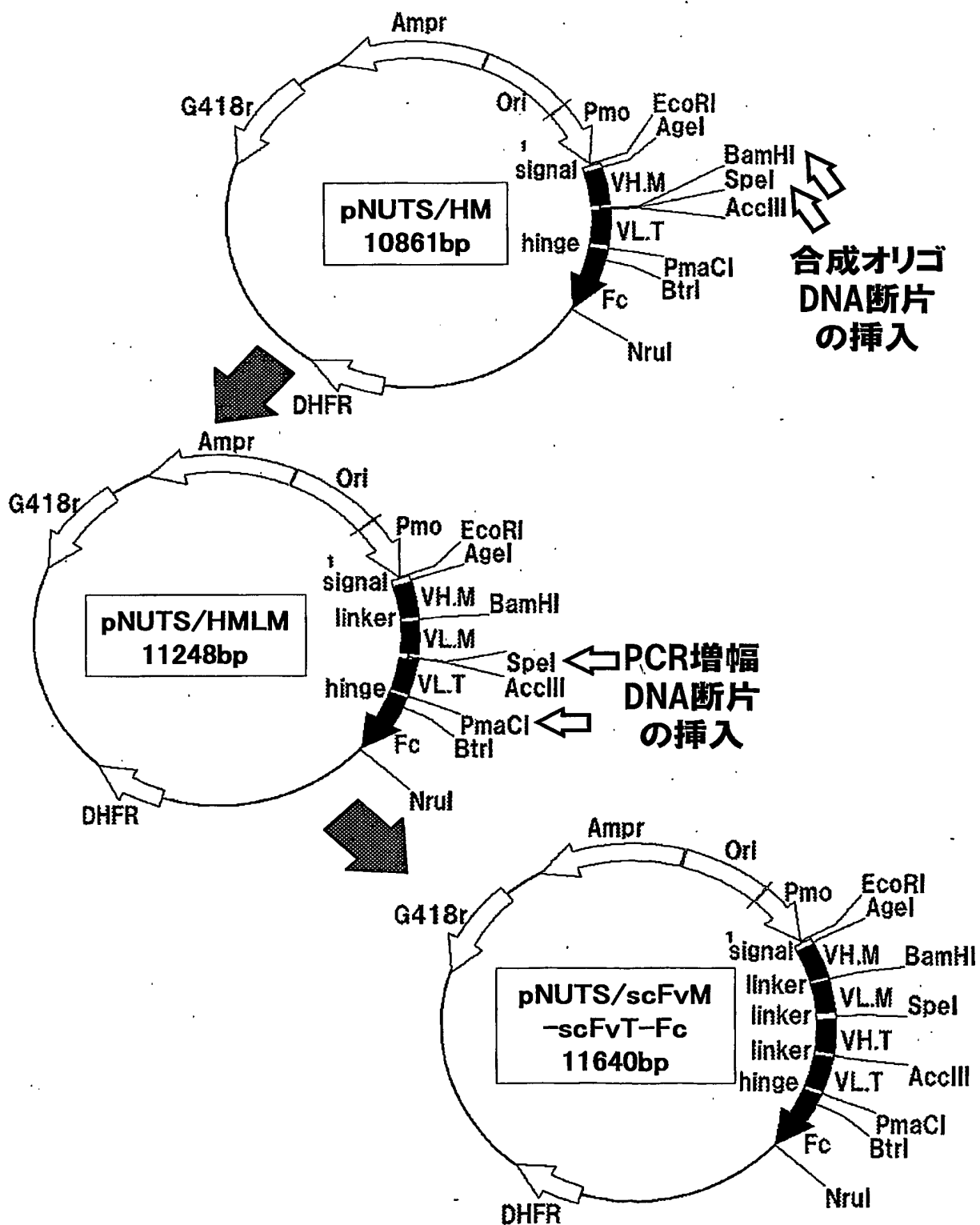
A



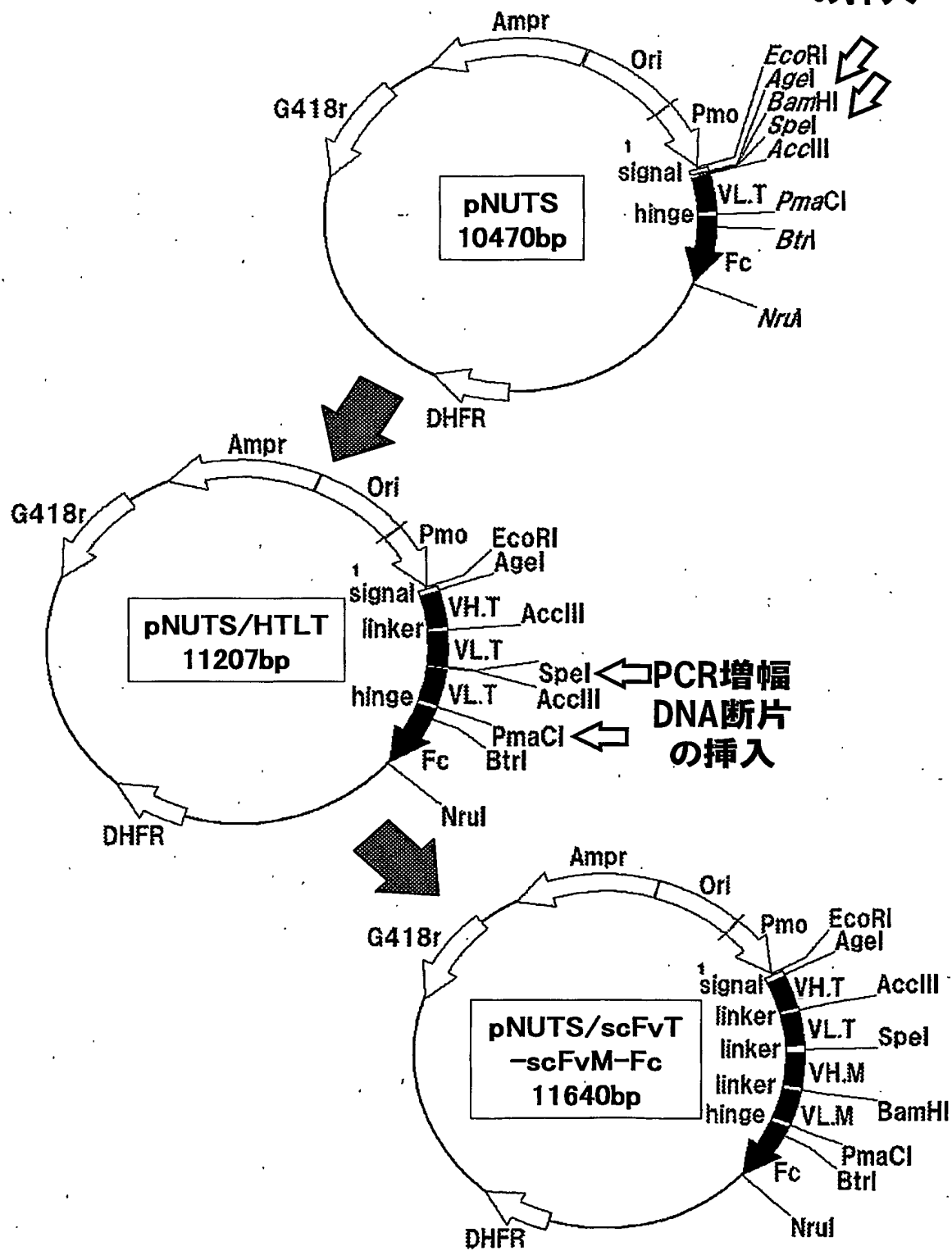
B



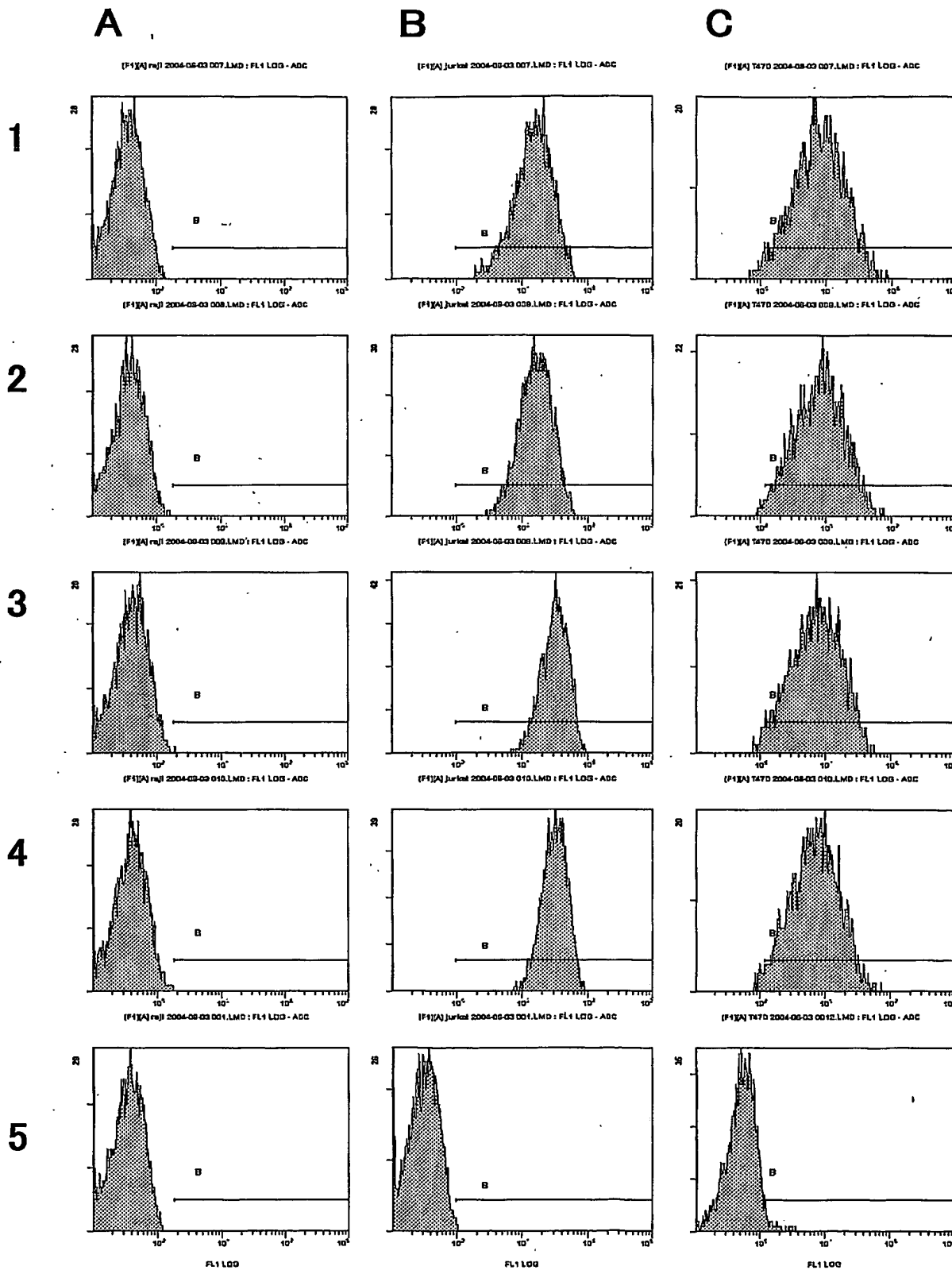
第22図



第23図

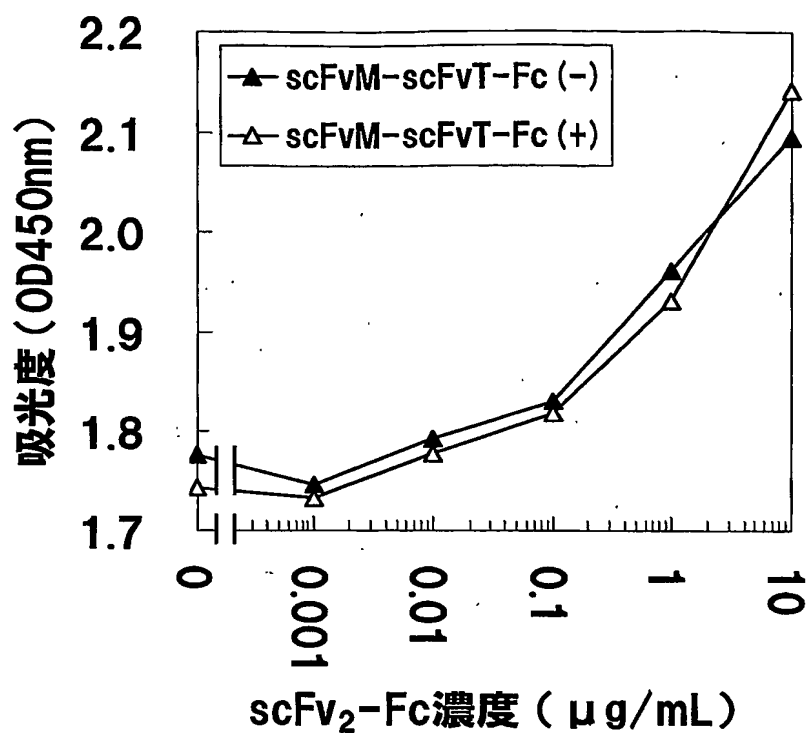
PCR増幅
DNA断片
の挿入

第24図

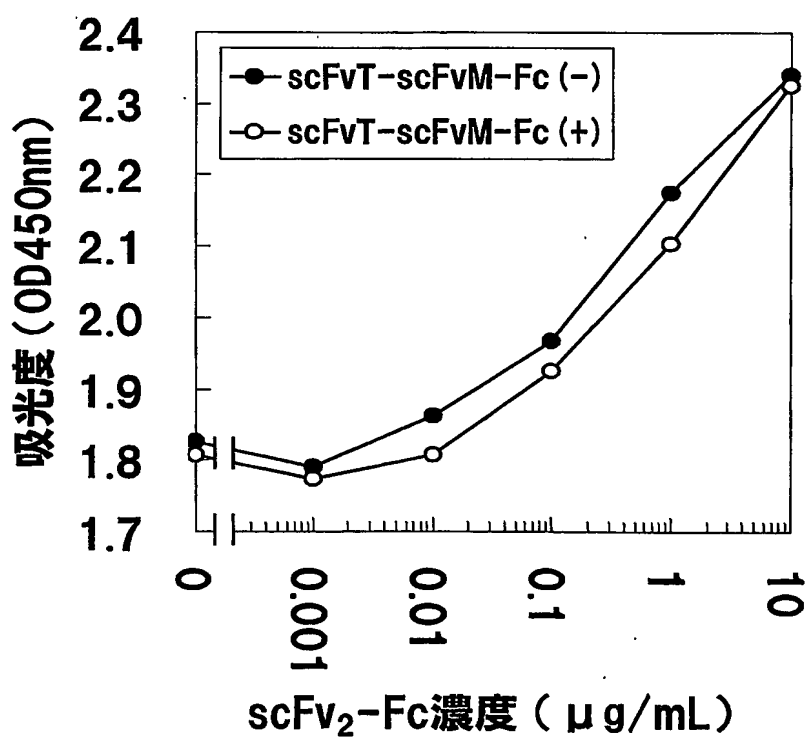


第25図

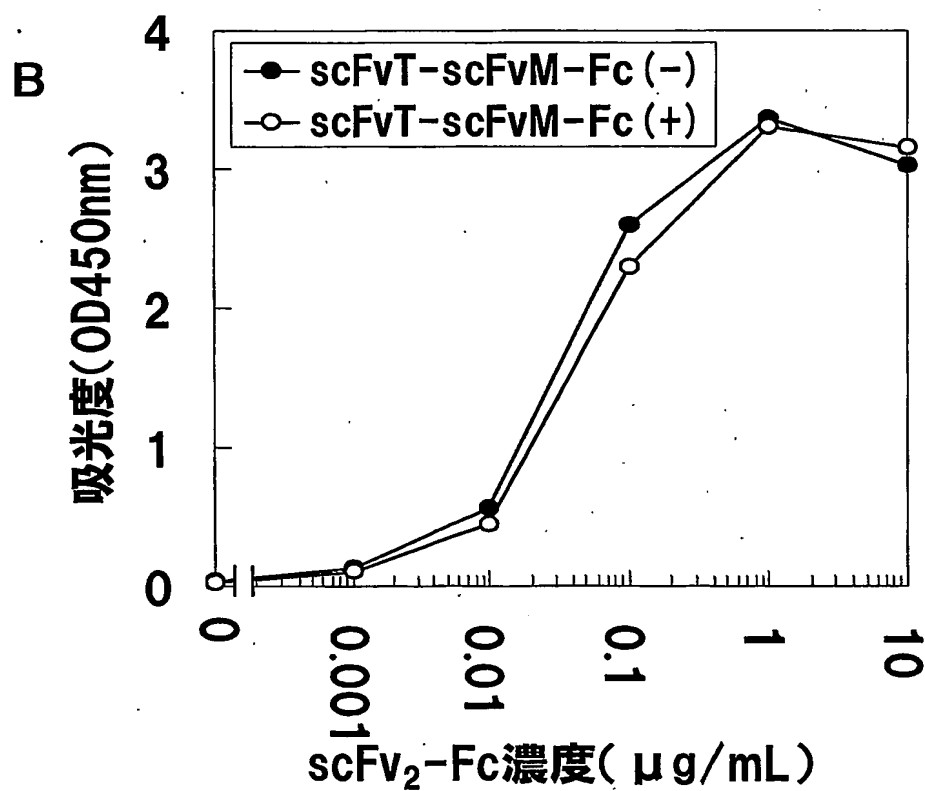
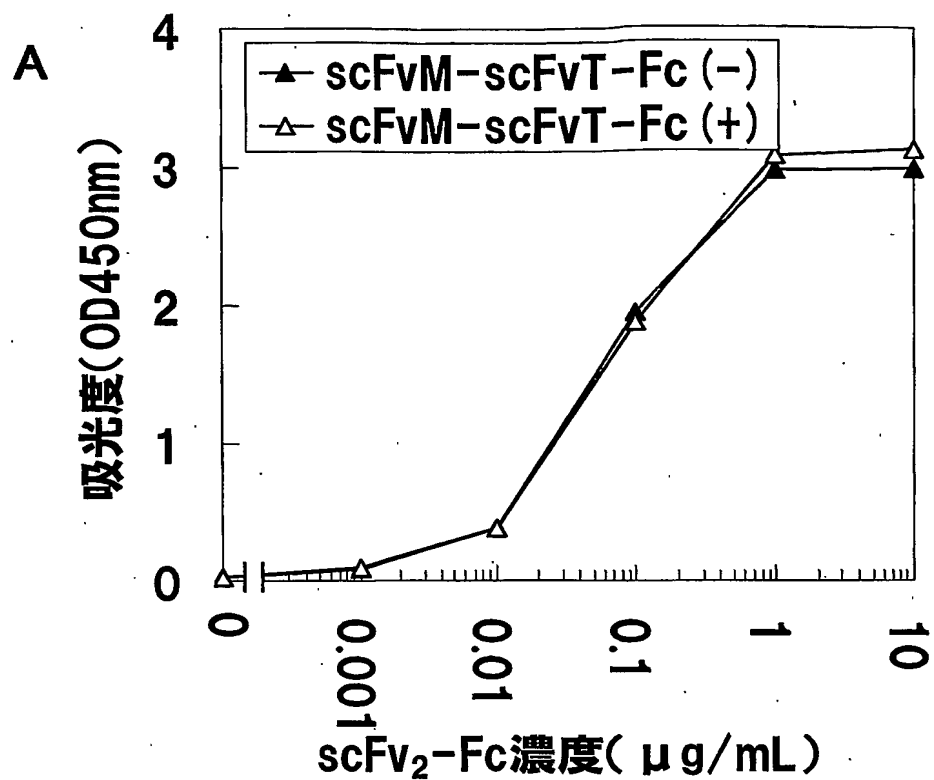
A



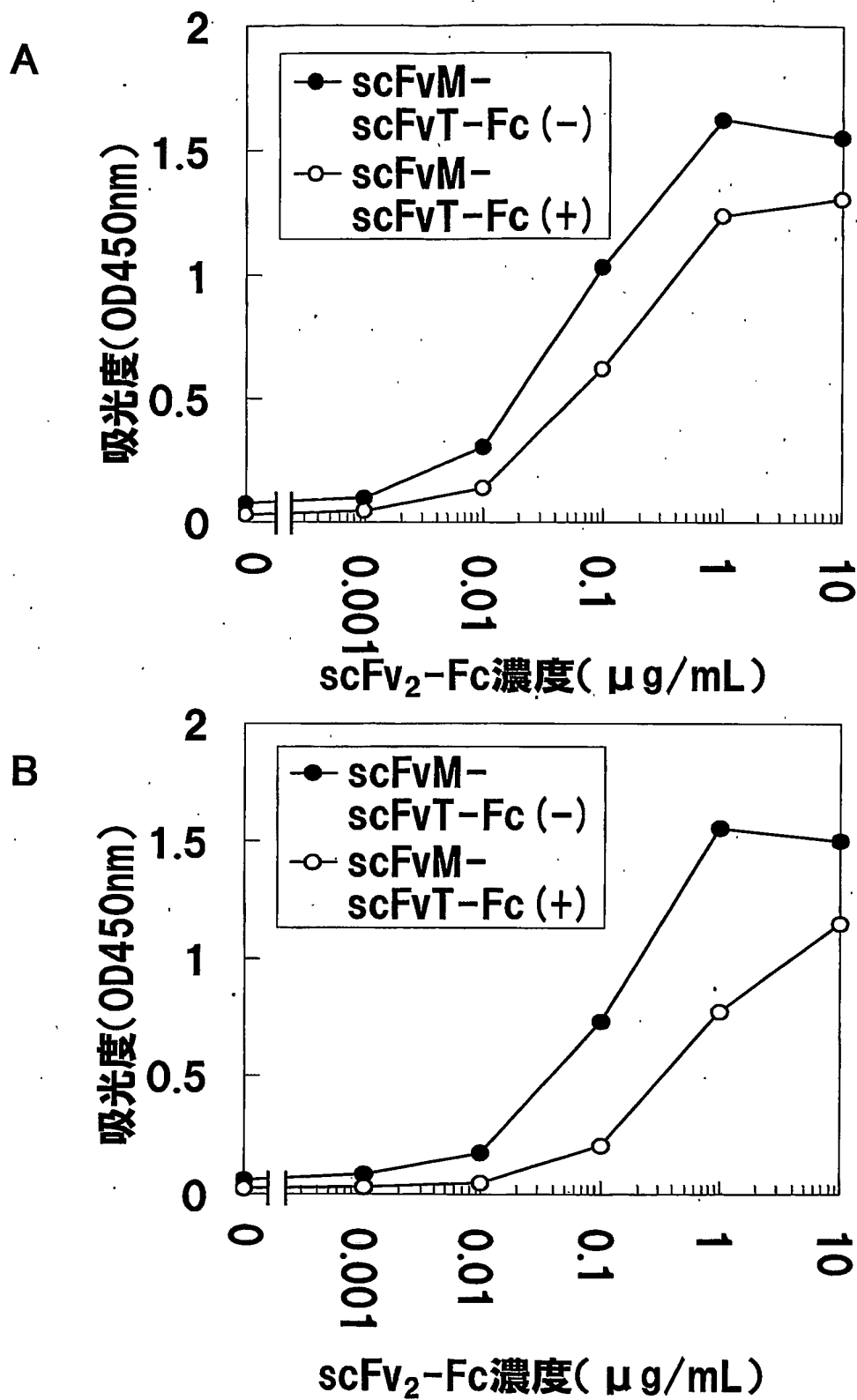
B



第26図

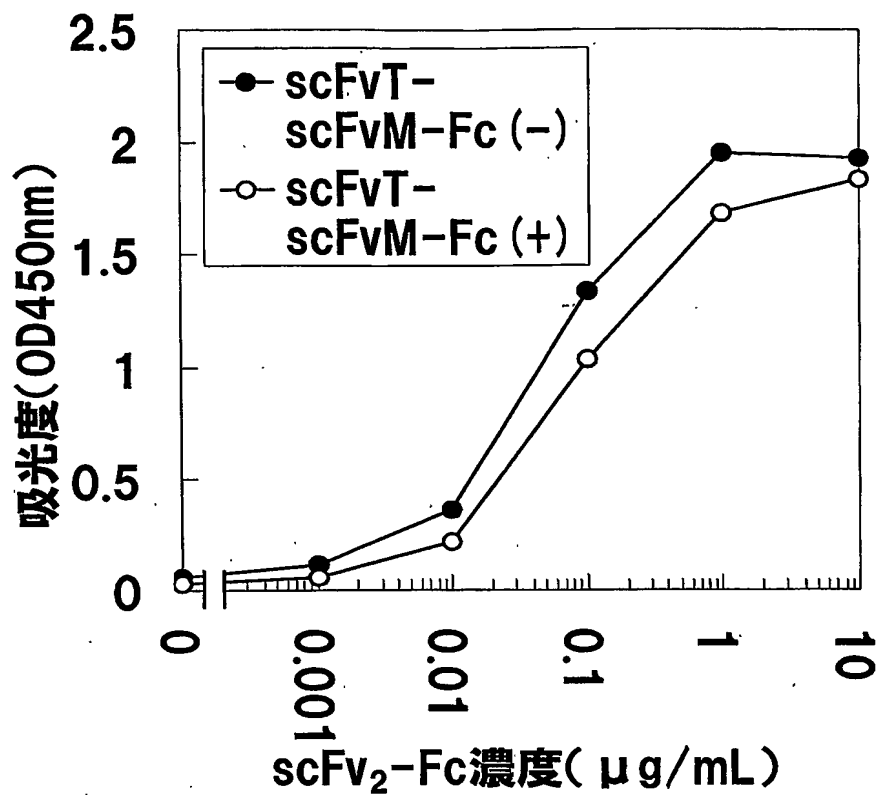


第27図

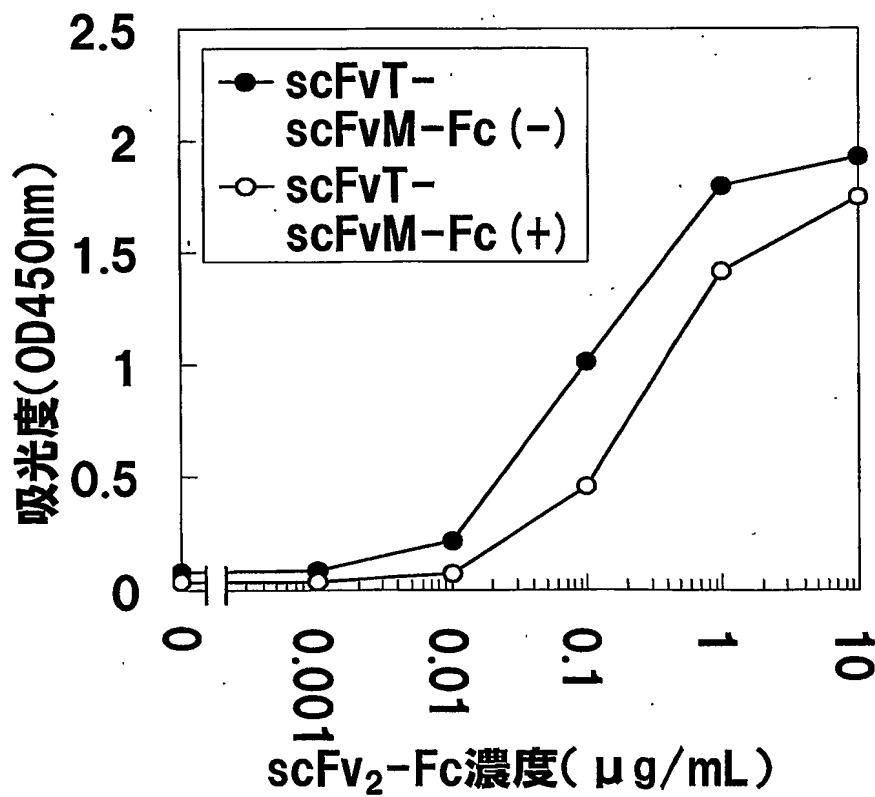


第28図

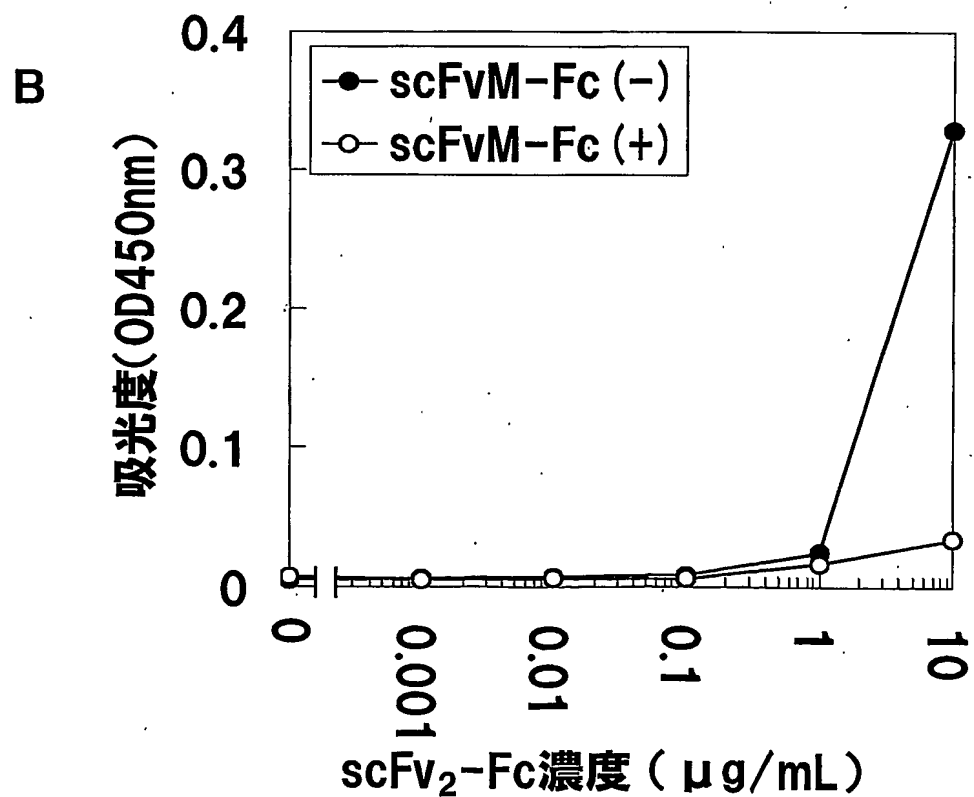
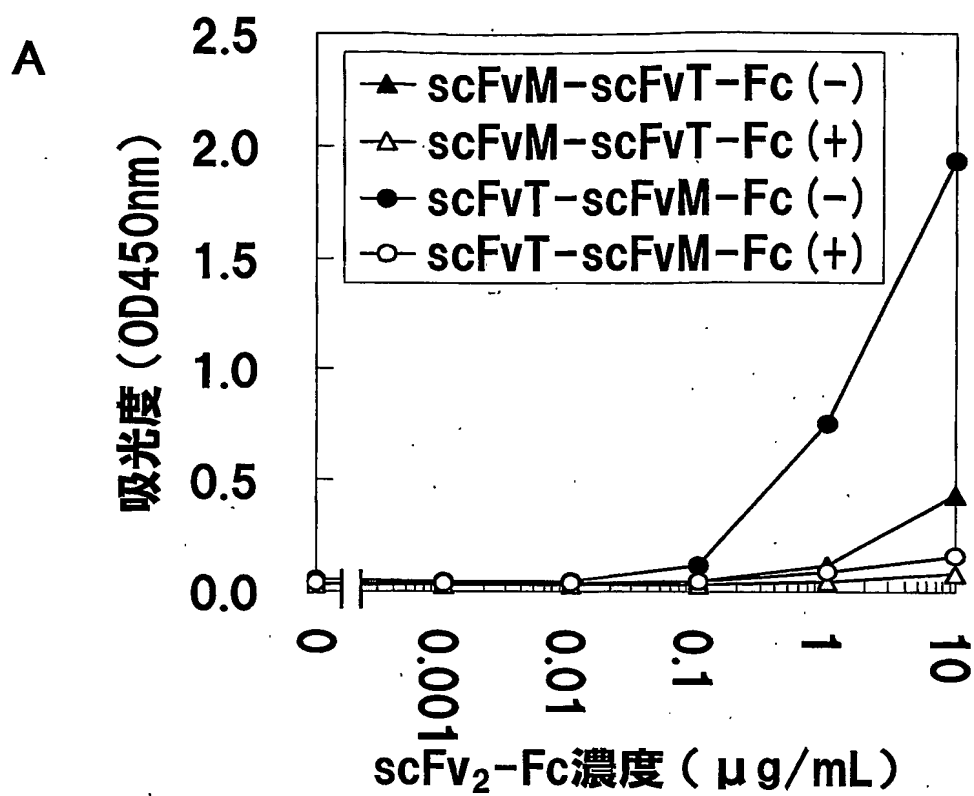
A



B

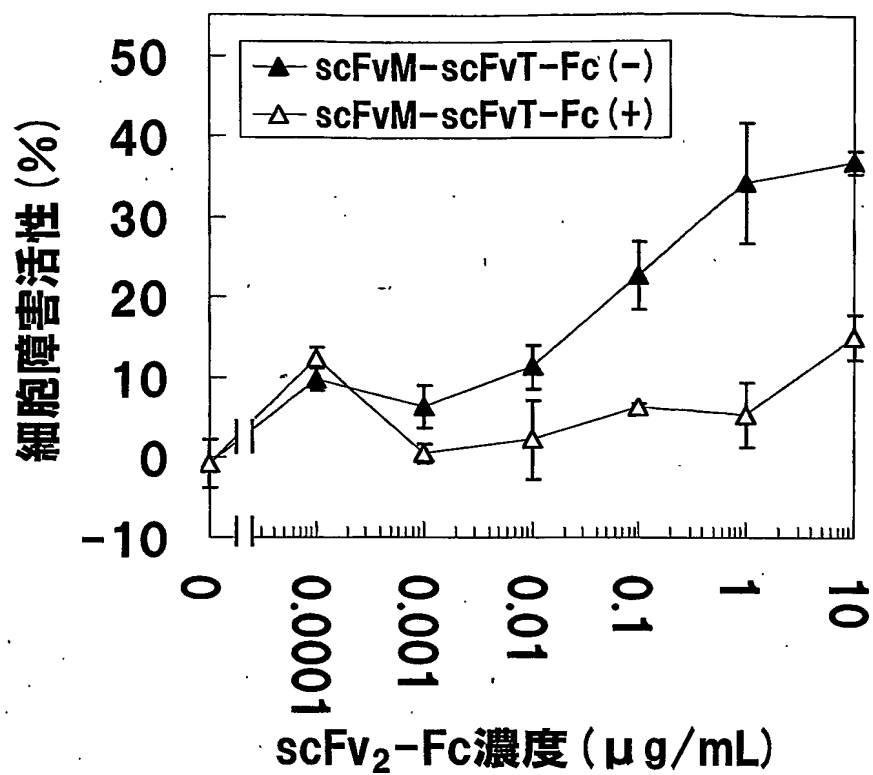


第29図

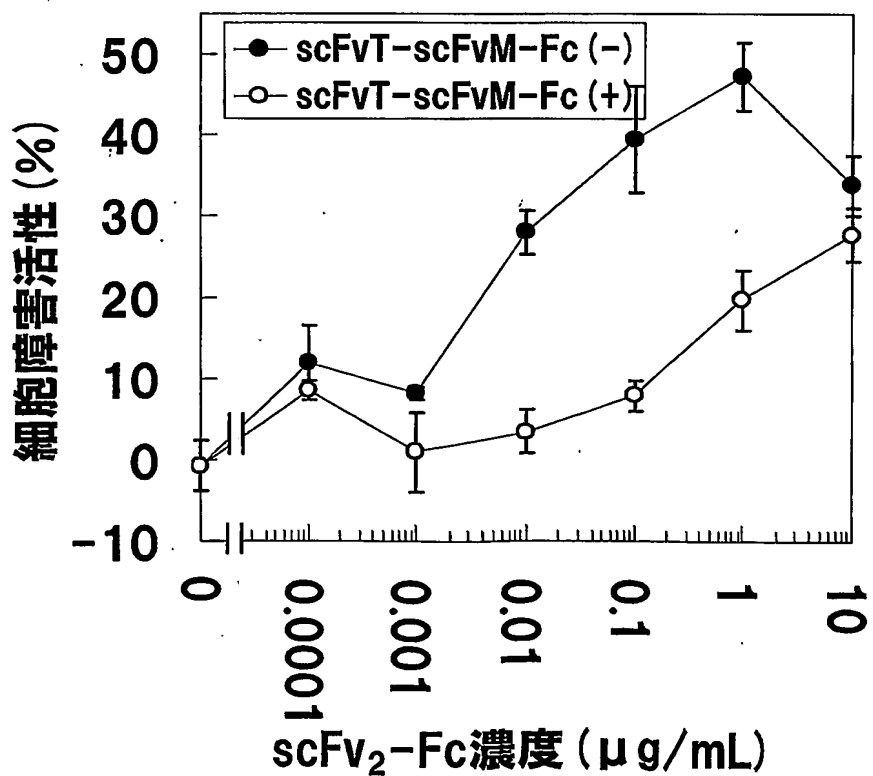


第30図

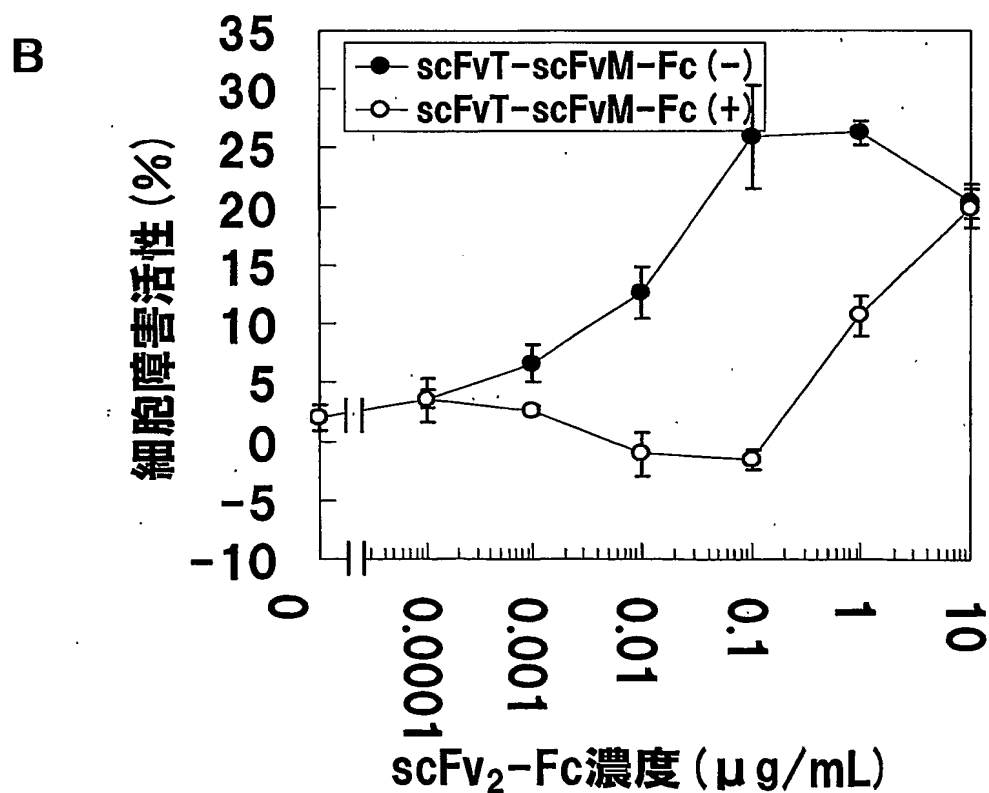
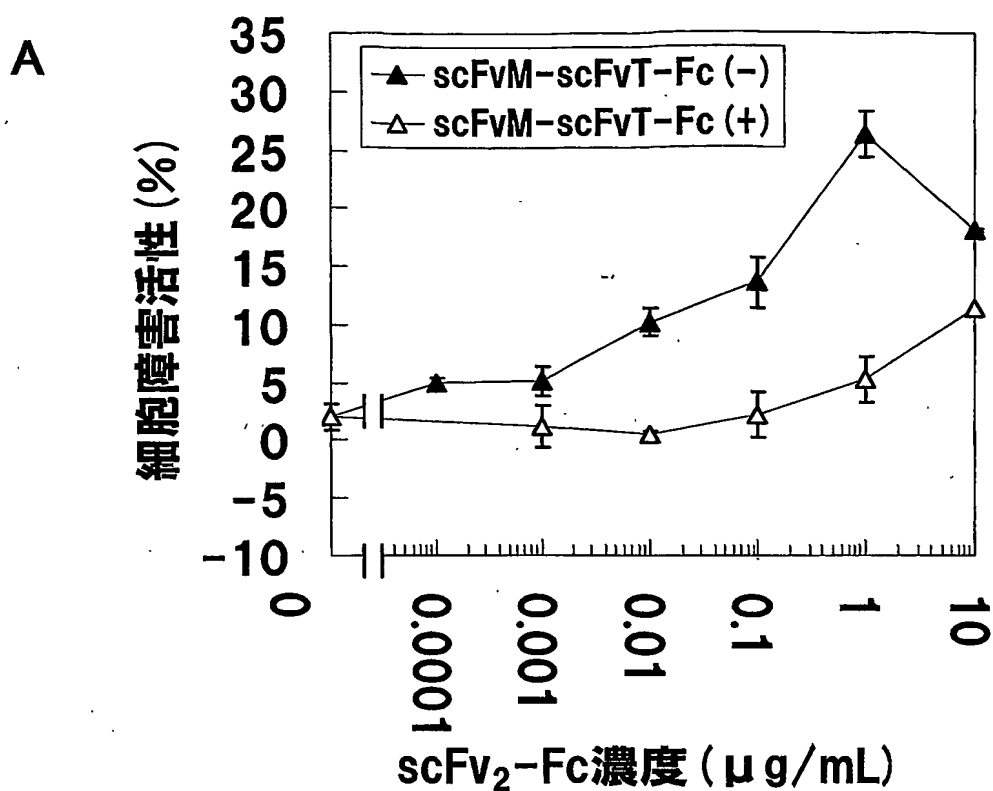
A



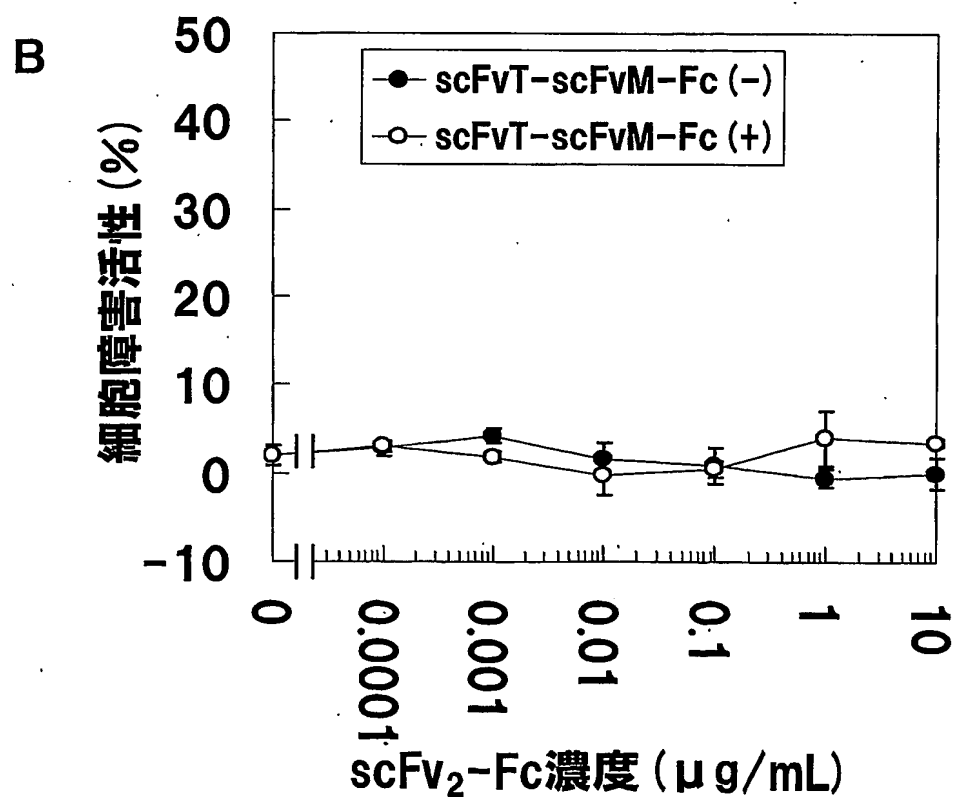
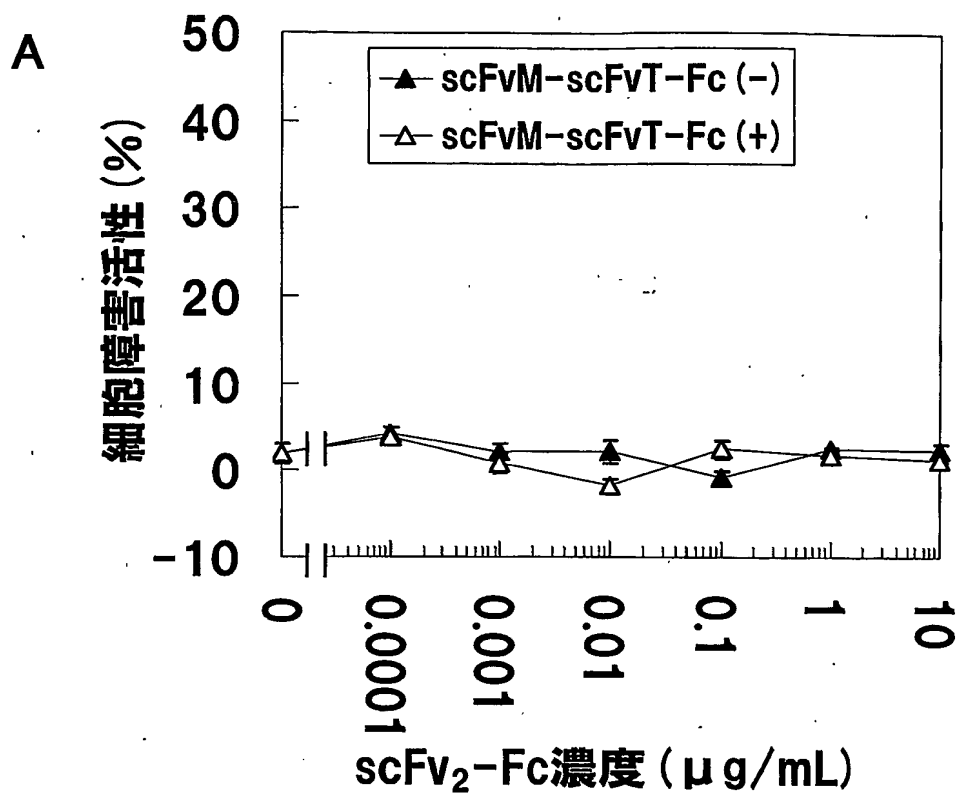
B



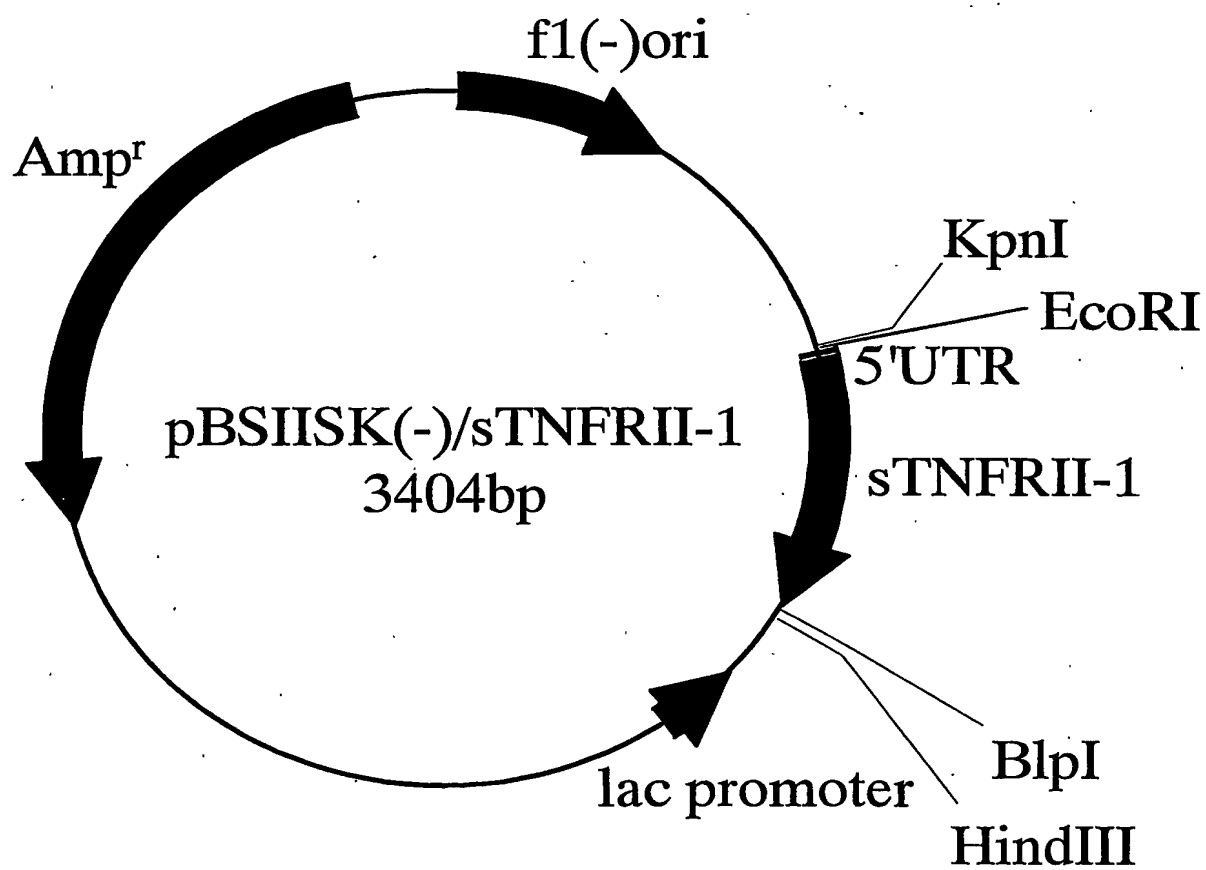
第31図



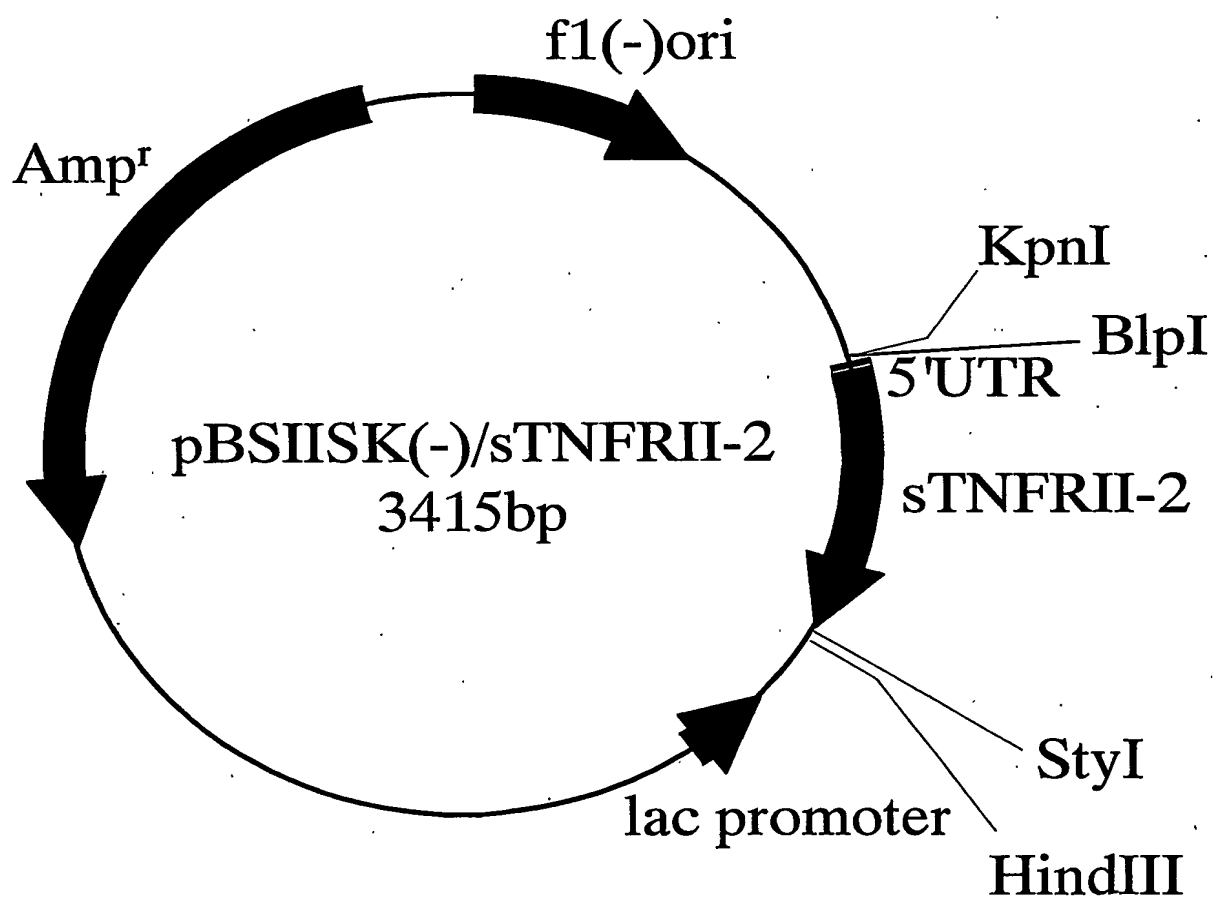
第32図



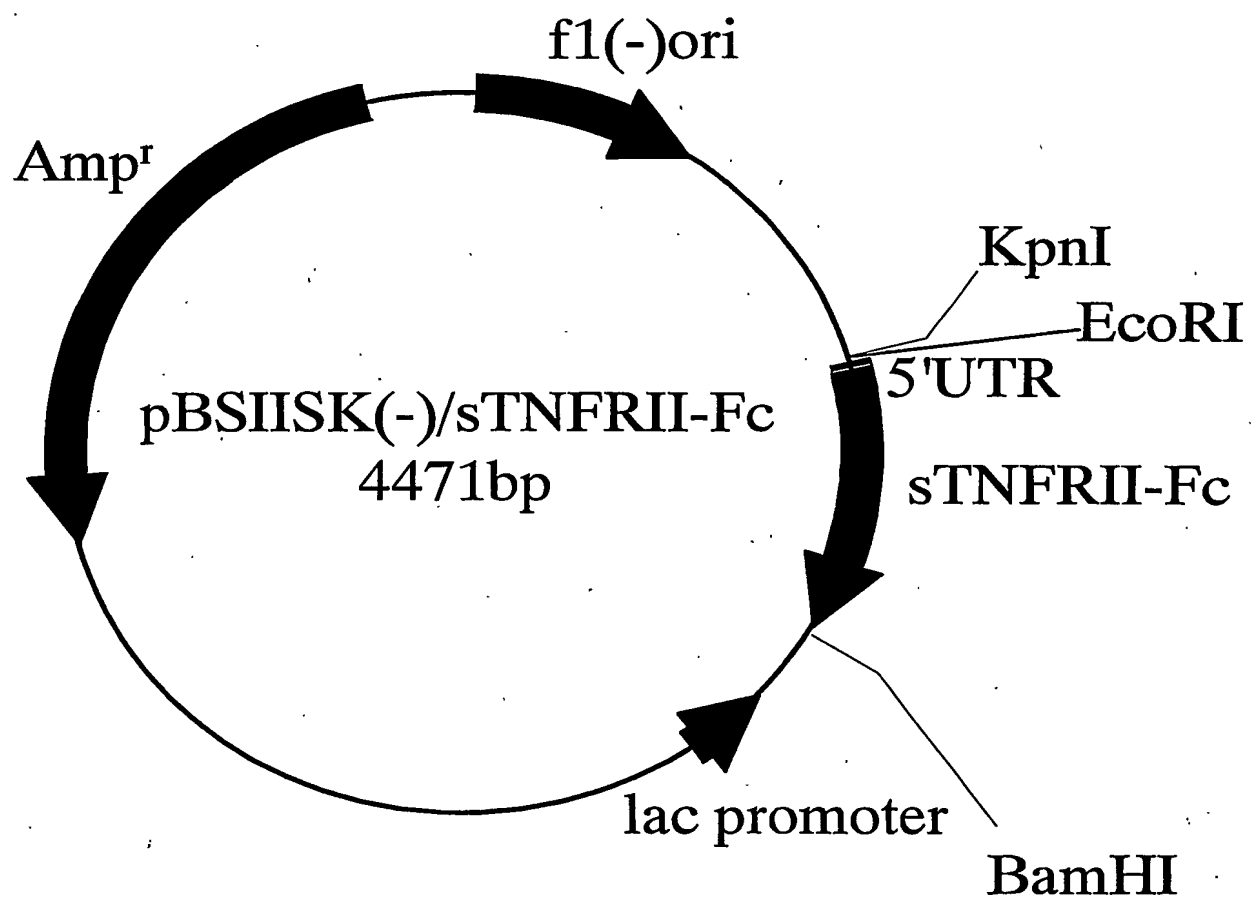
第33図



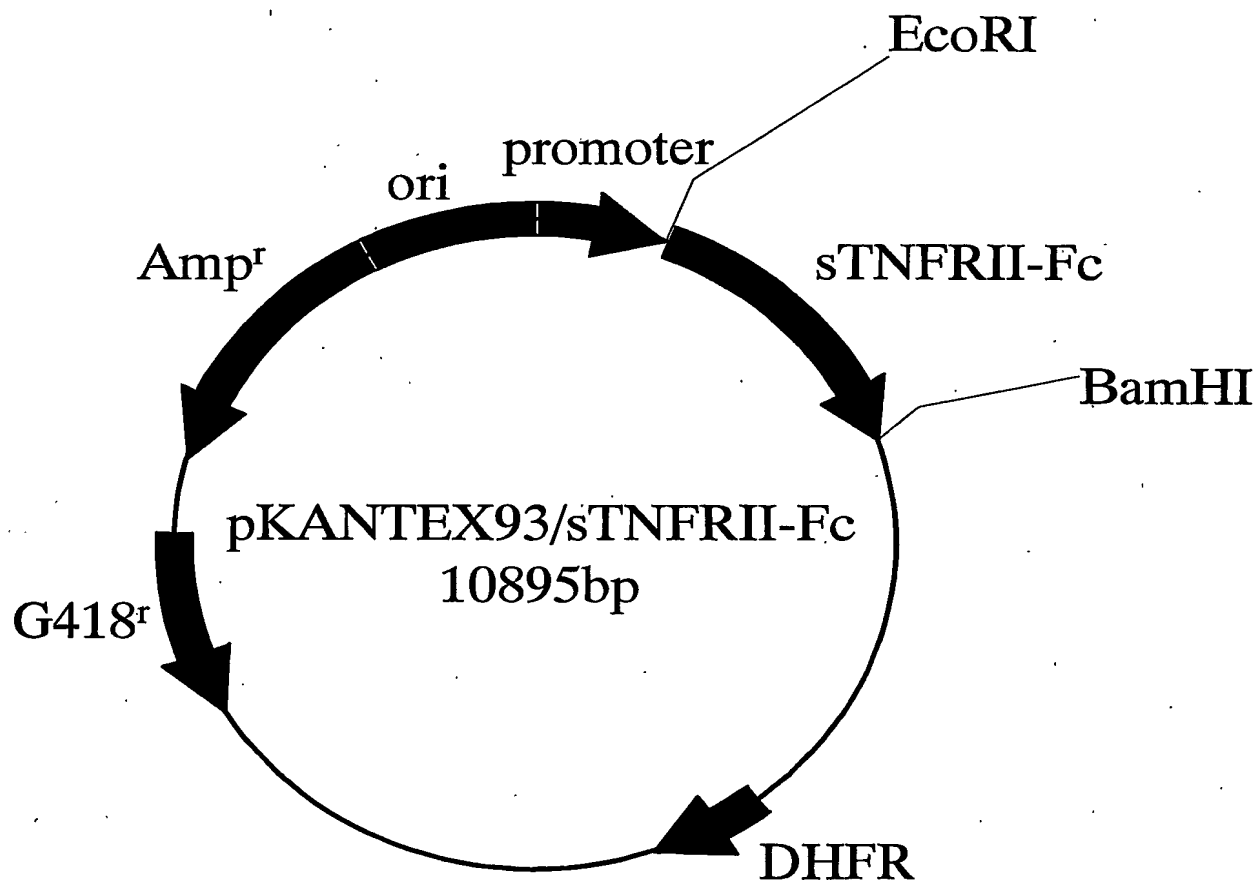
第34図



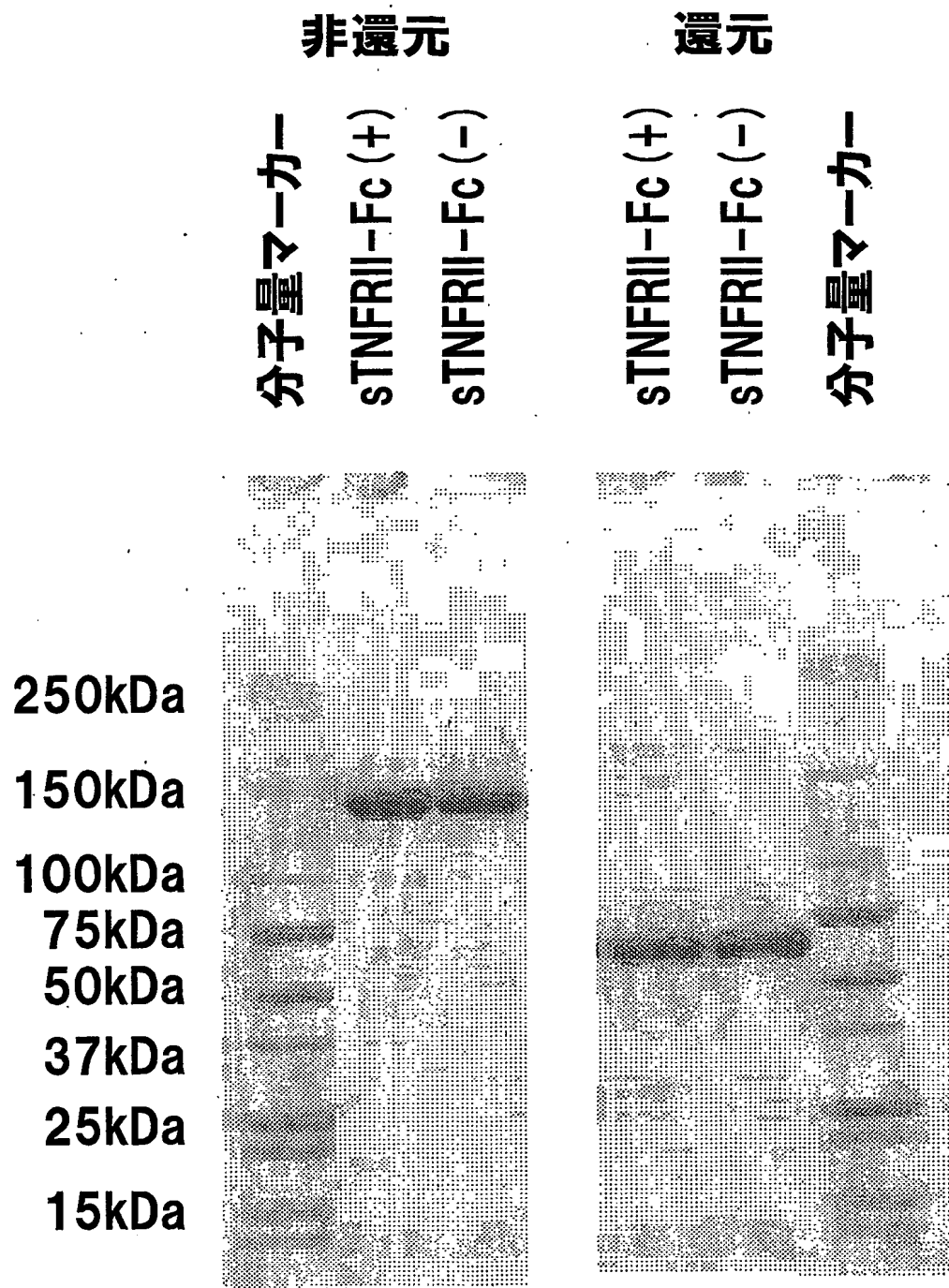
第35図



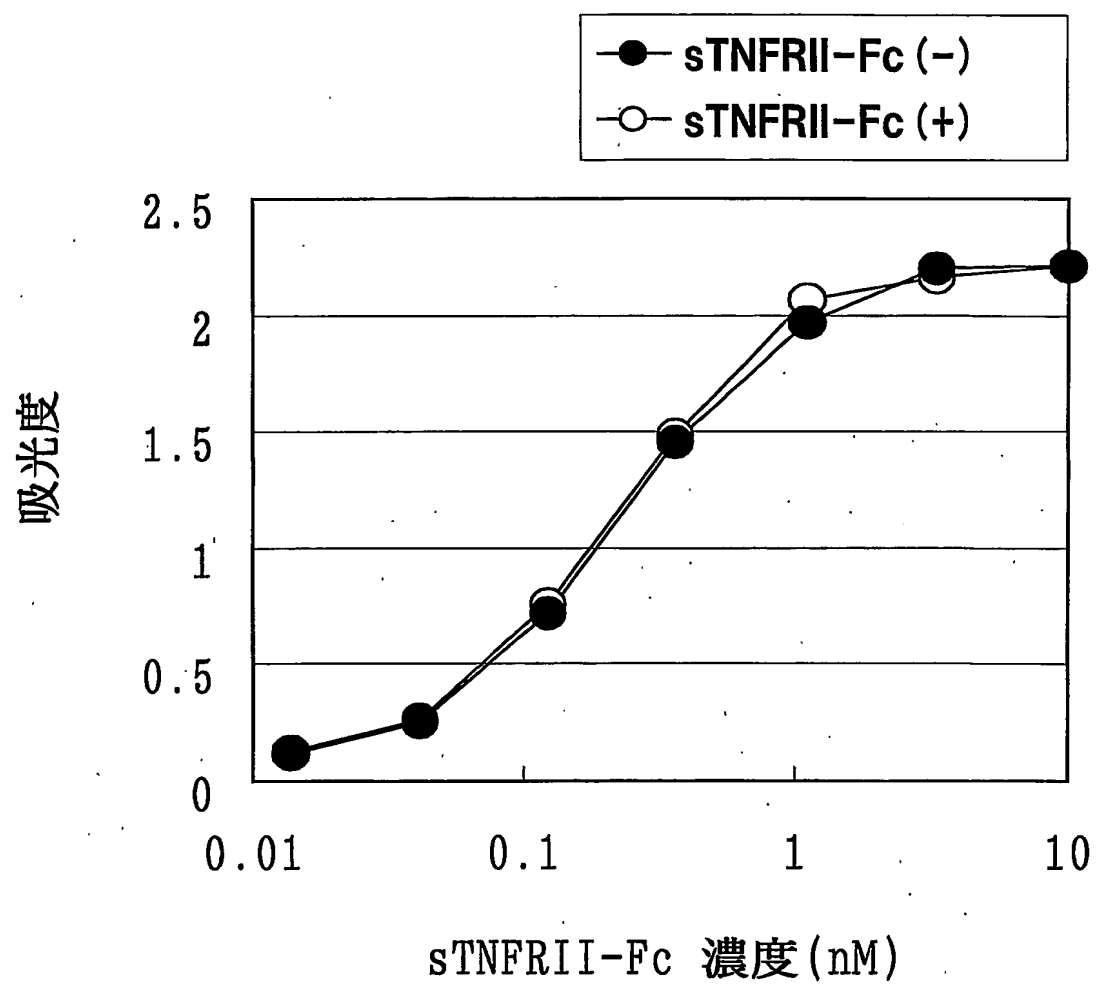
第36図



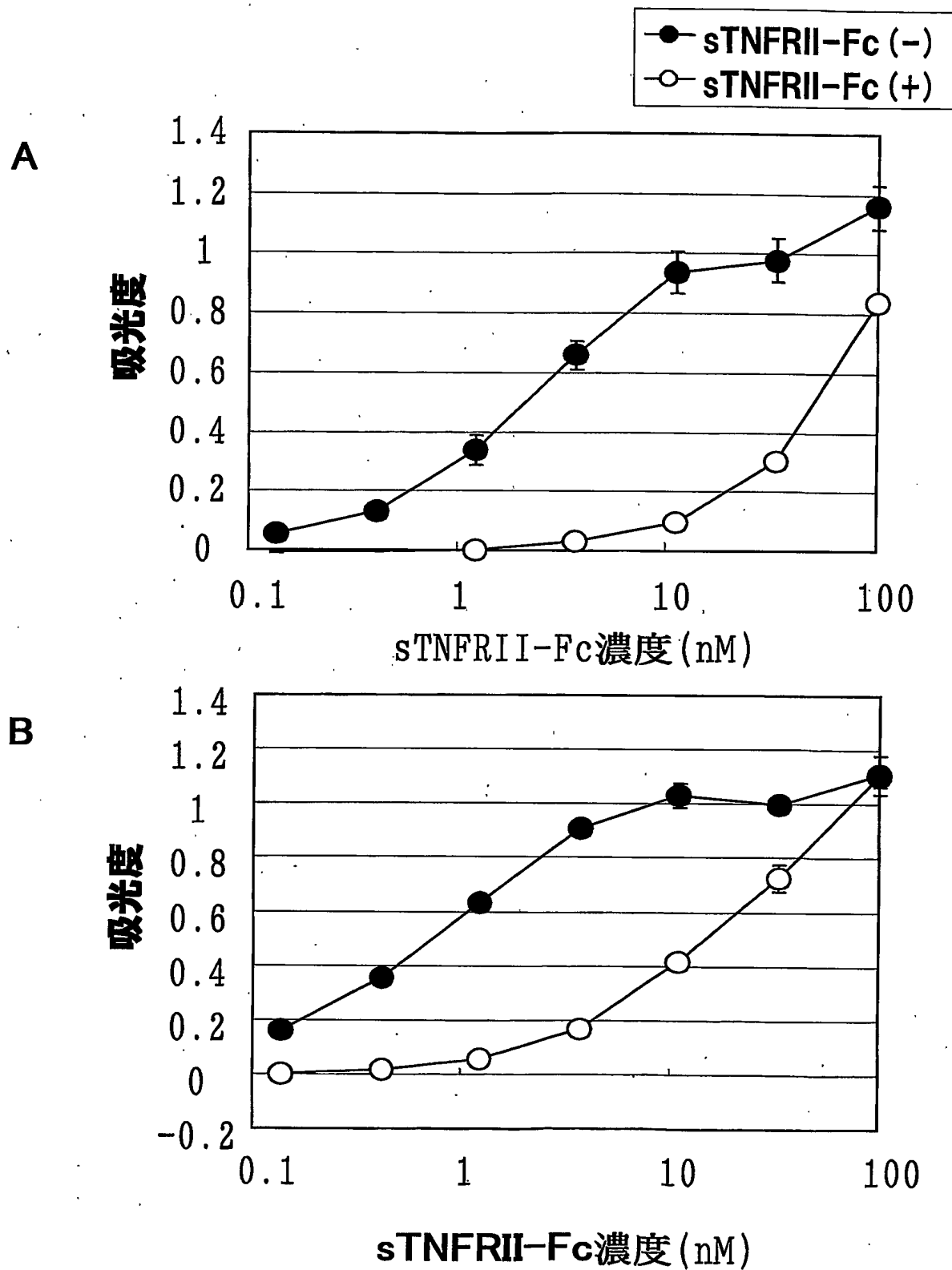
第37図



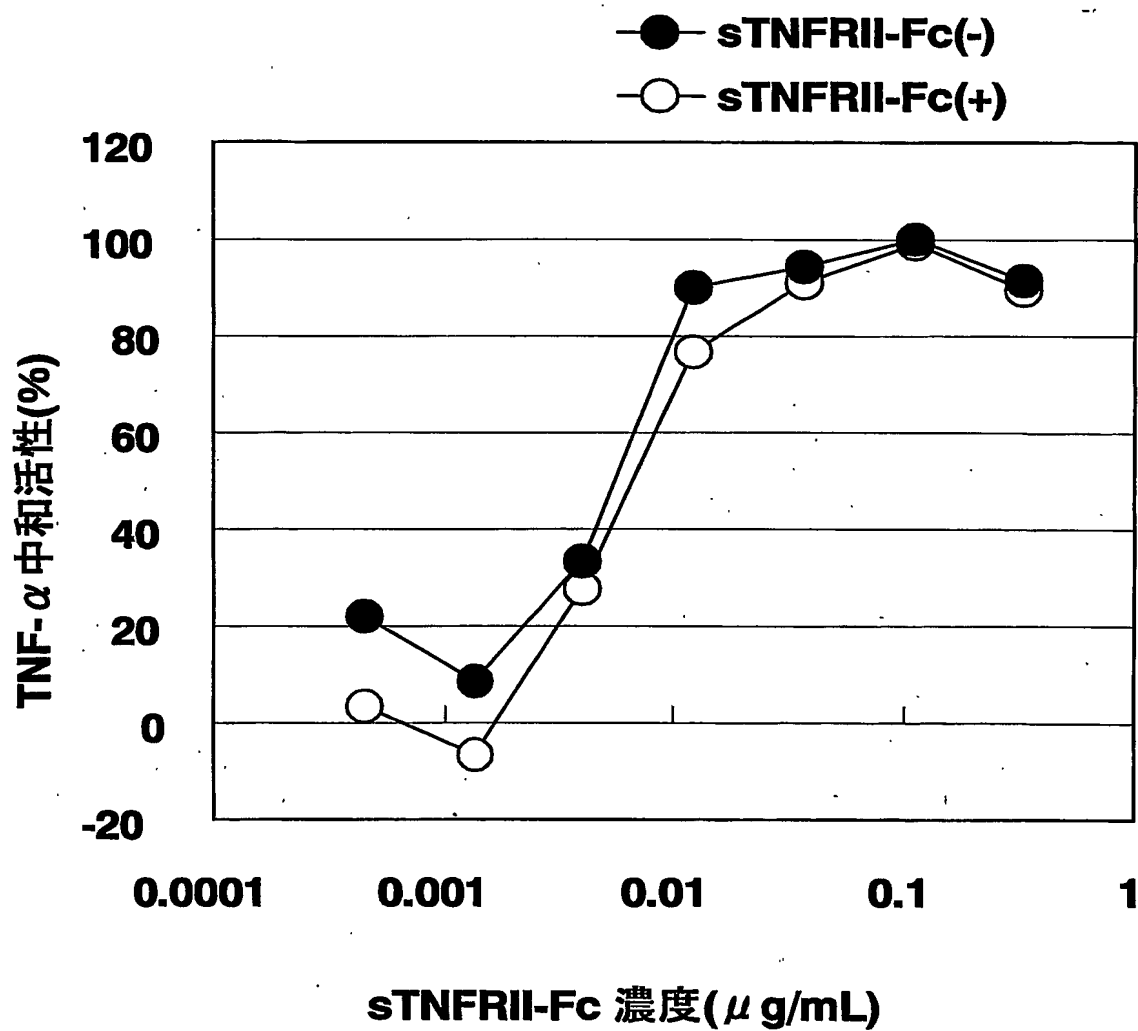
第38図



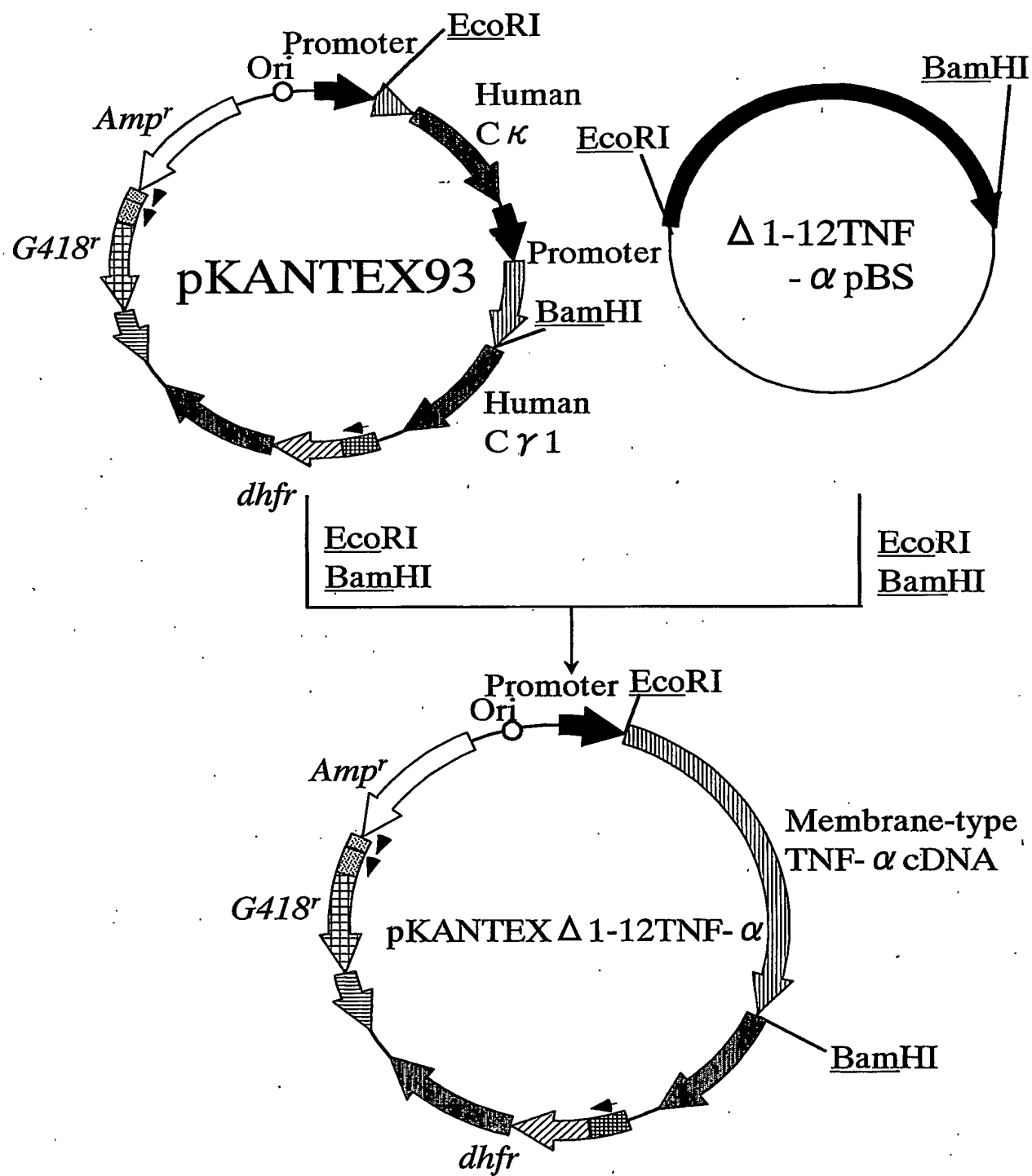
第39図



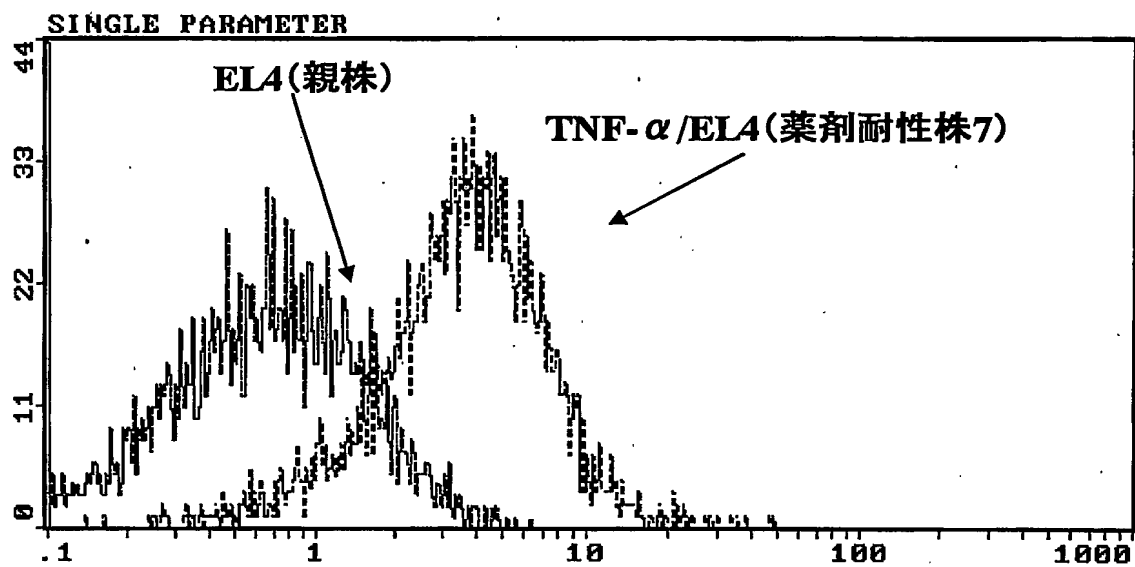
第40図



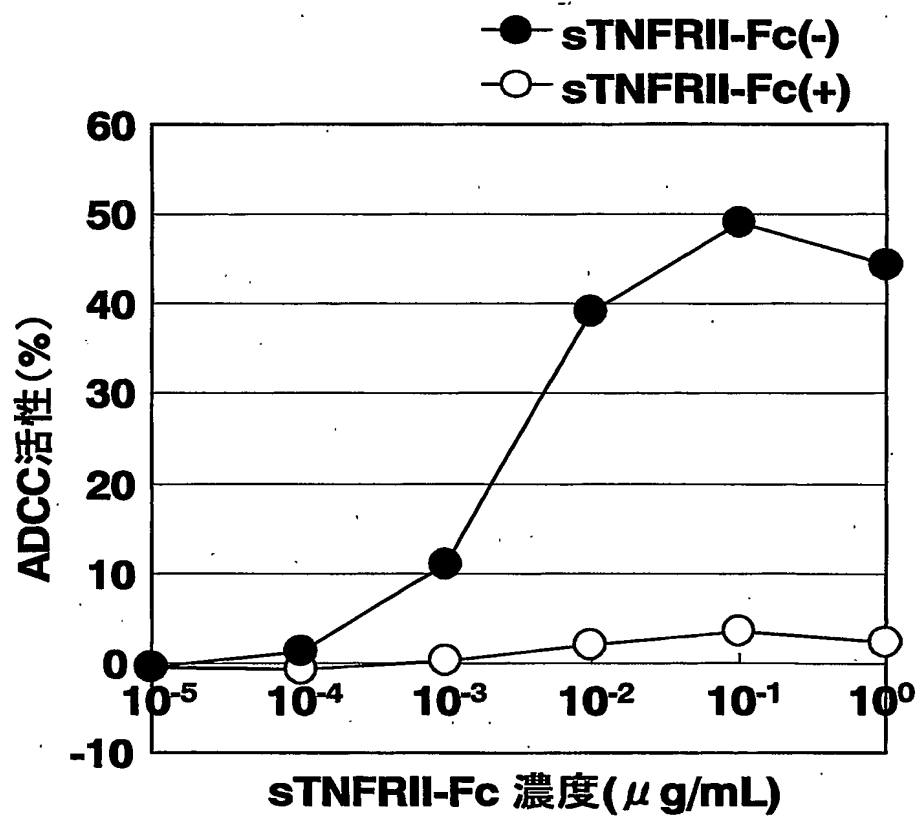
第41図



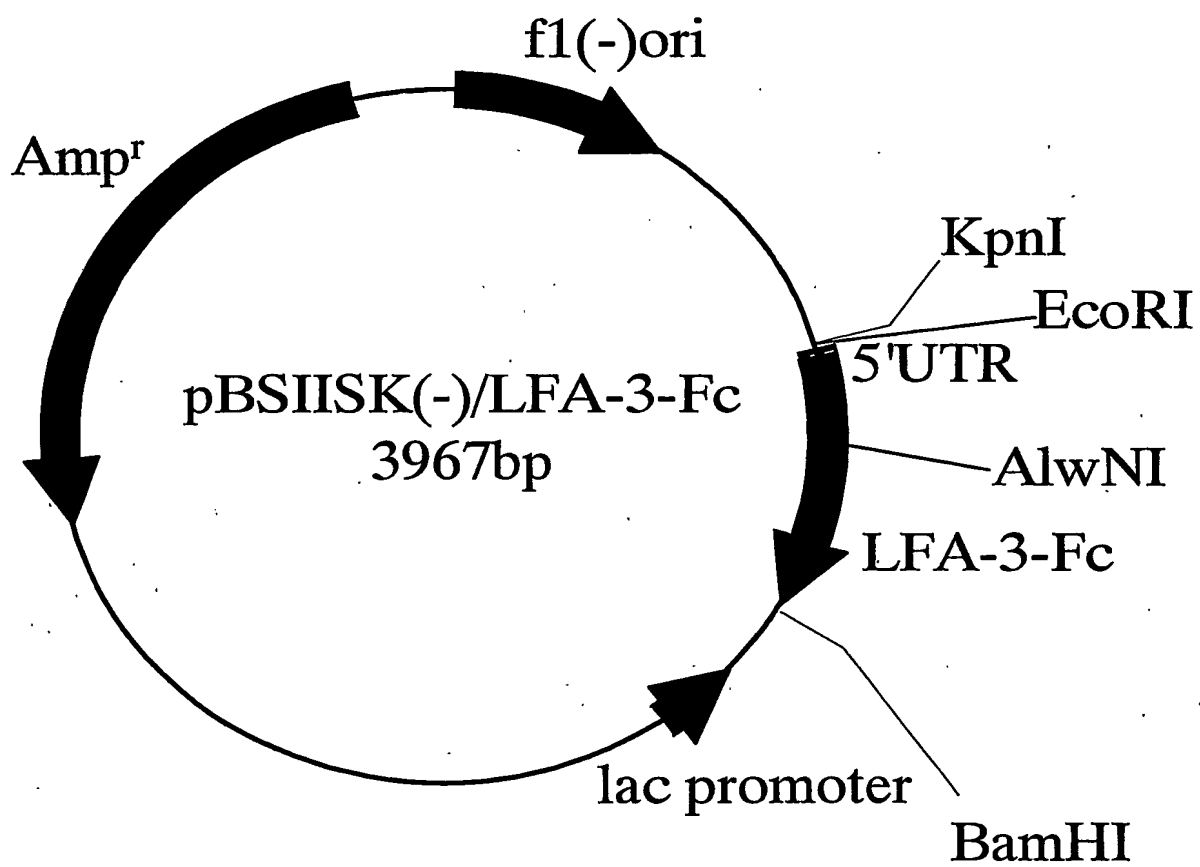
第42図



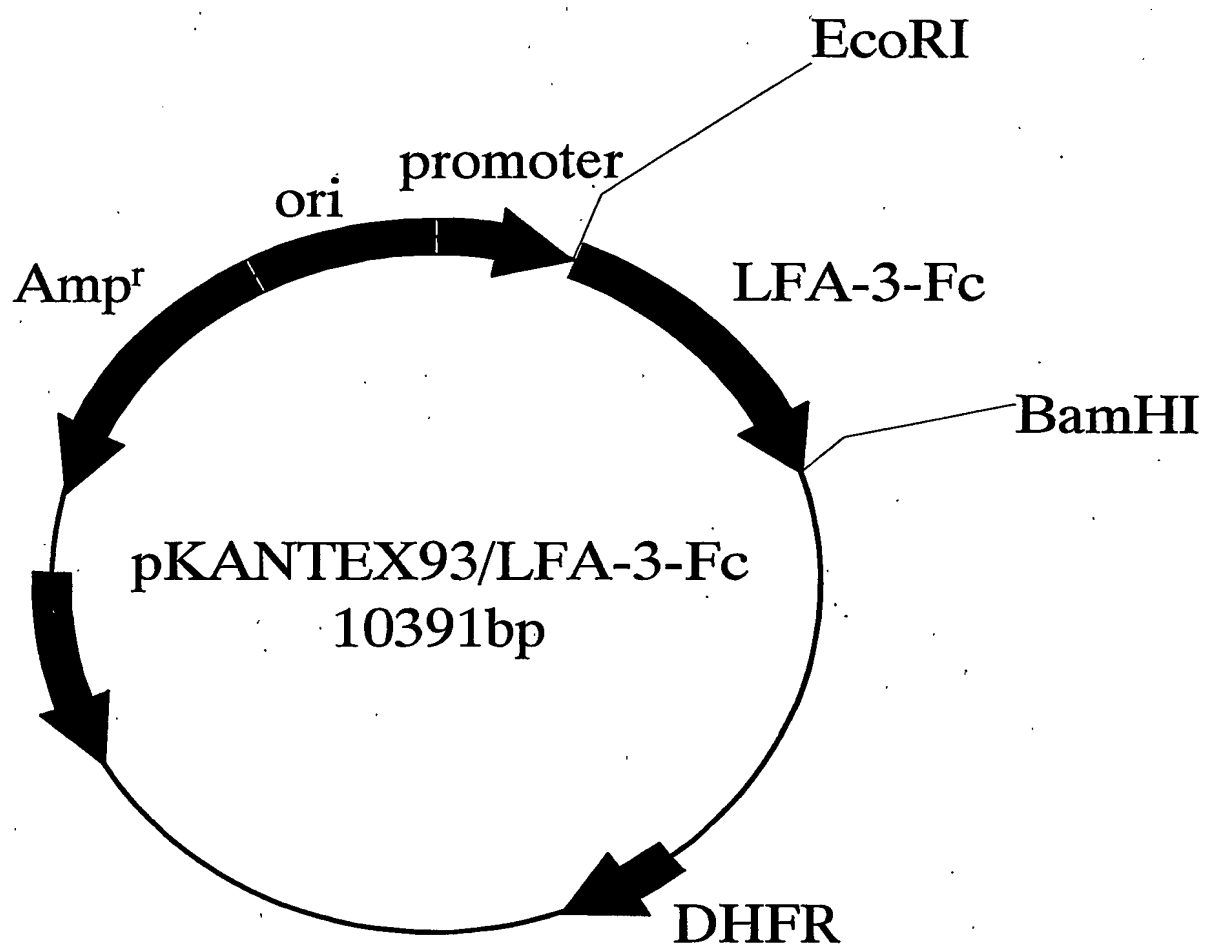
第43図



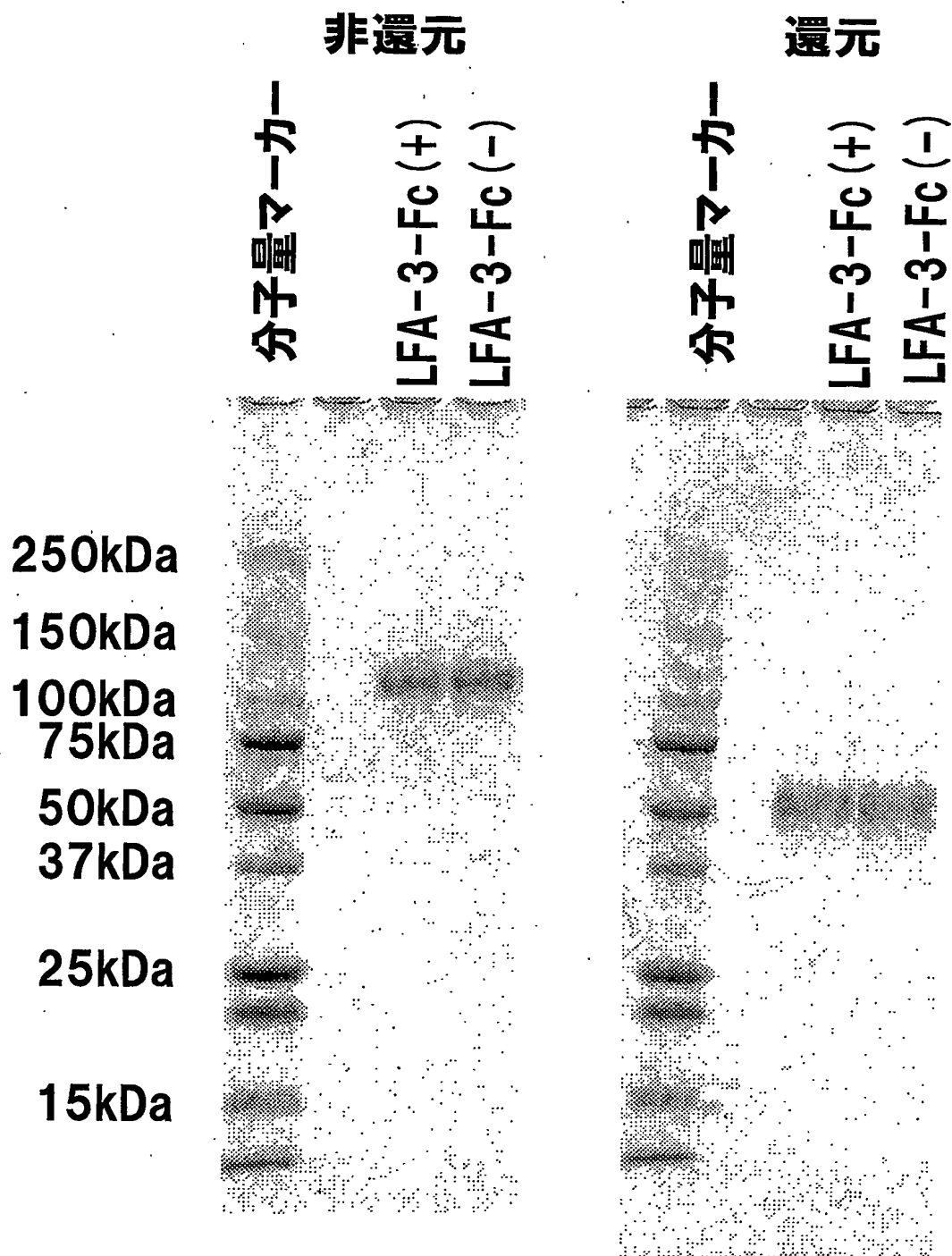
第44図



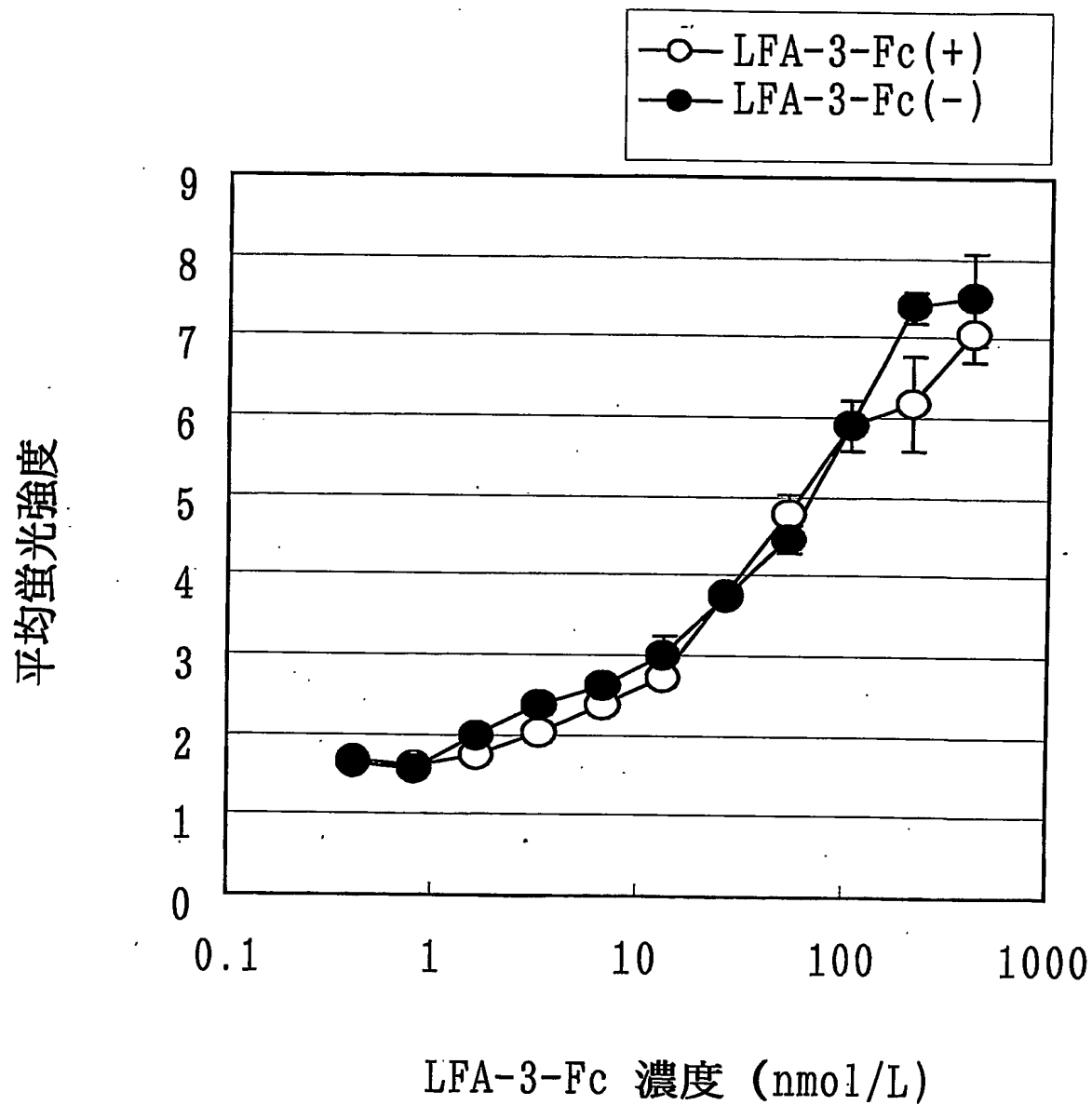
第45図



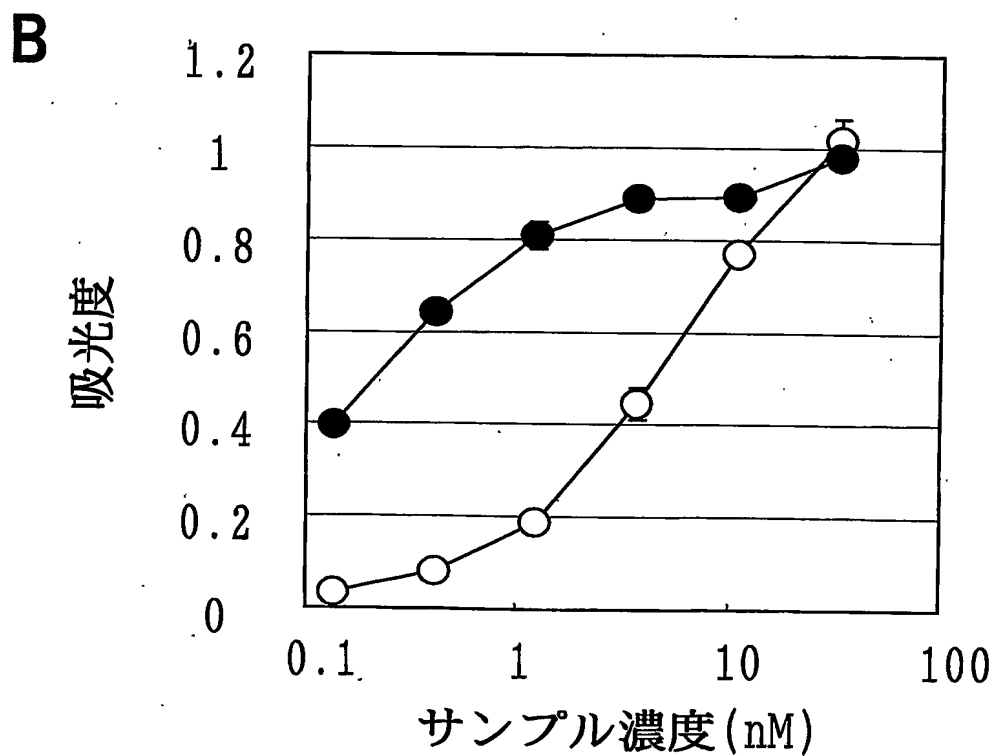
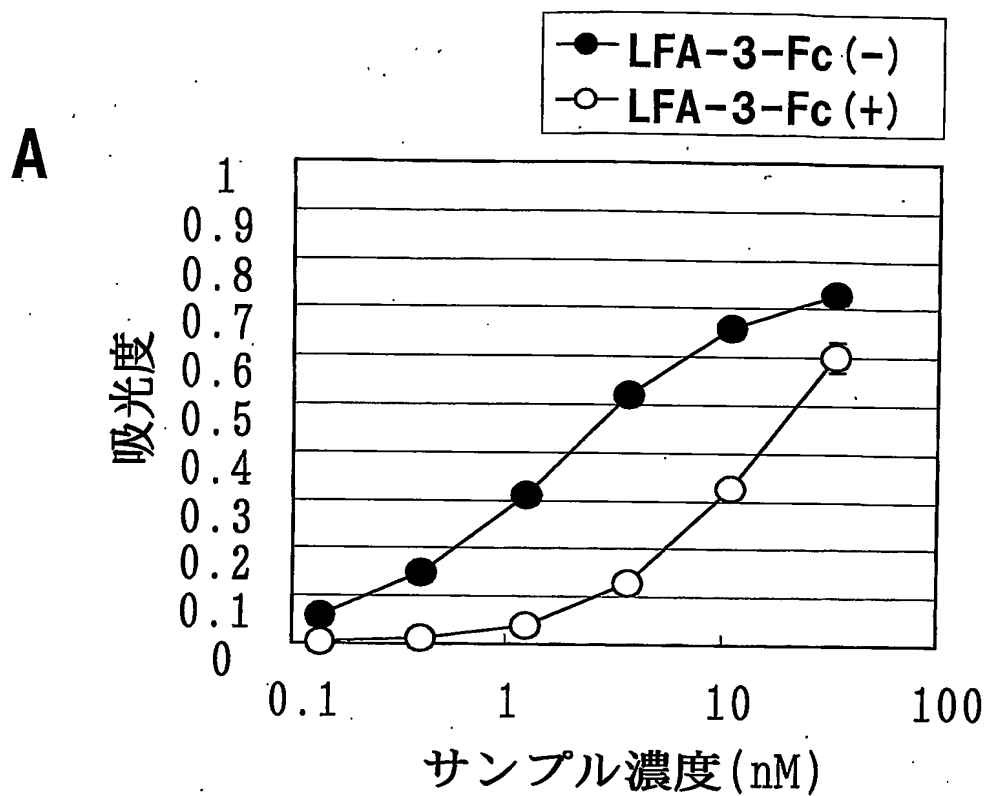
第46図



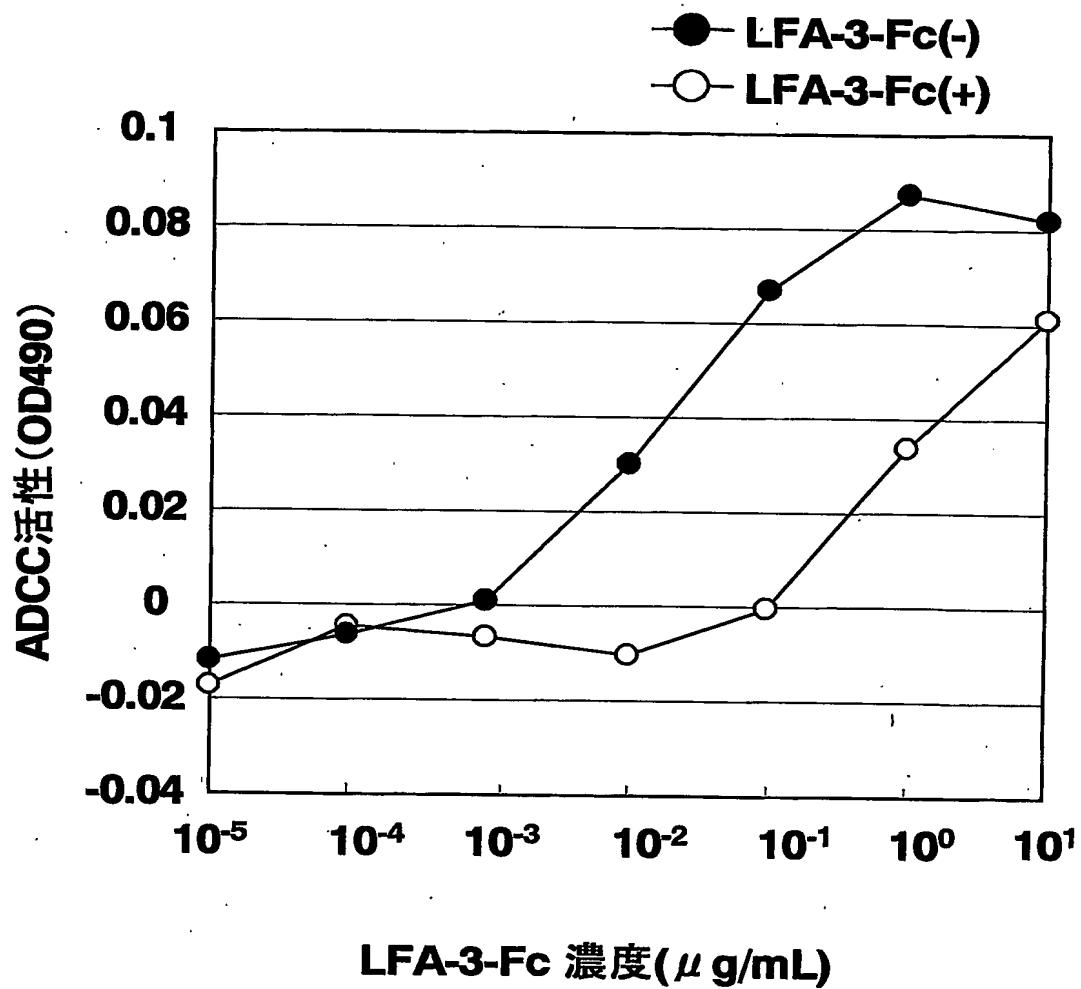
第47図



第48図



第49図



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Fusion protein composition

<130> 11613WO1

<150> P2003-350158

<151> 2003-10-08

<160> 113

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1504

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1119)

<400> 1

atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac	48
Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp	
1 5 10 15	

ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc	96
Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr	
20 25 30	

ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac	144
Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr	
35 40 45	

gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga	192
---	-----

Glu	Val	His	Gly	Ile	Val	Arg	Arg	Ser	Ser	Ser	Phe	Asn	Thr	Gly	Arg		
50						55					60						
att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg																	240
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met																	
65						70					75						80
aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc																	288
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile																	
85						90					95						100
atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc																	336
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser																	
						105					110					115	
cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat																	384
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp																	
						120					125					130	
gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt																	432
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu																	
						135										145	
ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga																	480
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly																	
						150										160	
aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg																	528
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg																	
165						170										175	180
tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac																	576
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn																	
						185					190					195	
ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat																	624
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn																	
						200					205					210	

cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc 672
 His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
 215 220 225

cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg 720
 Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
 230 235 240

gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc 768
 Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
 245 250 255 260

gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc 816
 Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
 265 270 275

ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca 864
 Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
 280 285 290

ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat 912
 Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
 295 300 305

gaa gtg ggc aga tgt aaa gag acc ggc aaa att cat gtg act gtg gat 960
 Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
 310 315 320

ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc 1008
 Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
 325 330 335 340

tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac 1056
 Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
 345 350 355

gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc 1104
 Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
 360 365 370

aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaattc gcgagacatg gactatgggtg 1159
 Asn Pro Asn Ala
 375

cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagaccat cgaccataaa ccctcgactg 1219
 cctgtgtcgt cccacagct aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac 1279
 actccagagc taaggccact tcgtttttgt caaaggctcc tctcaatgat tttgggaaat 1339
 caagaagttt aaaatcacat actcatttta cttgaaatta tgtcactaga caacttaaata 1399
 ttttgagtct tgagattgtt tttctctttt cttattaaat gatctttcta tgaccagca 1459
 aaaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1504

<210> 2

<211> 376

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 2

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
 1 5 10 15

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
 20 25 30

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
 35 40 45

Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
 50 55 60

Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
 65 70 75 80

Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile

85	90	95	100
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser			
105	110	115	
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp			
120	125	130	
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu			
135	140	145	
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly			
150	155	160	
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg			
165	170	175	180
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn			
185	190	195	
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn			
200	205	210	
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser			
215	220	225	
Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu			
230	235	240	
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val			
245	250	255	260
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val			
265	270	275	
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser			
280	285	290	

Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
 295 300 305

Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
 310 315 320

Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
 325 330 335 340

Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
 345 350 355

Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
 360 365 370

Asn Pro Asn Ala
 375

<210> 3

<211> 1316

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 3

gccccgcccc ctccacctgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60

tggactggtg gaacctgcg caggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120

gacctagtg acagggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtcgcaga 180

tggcgctggc ttaccggag aggaatgggt gtttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240

ggatgcagca caaaccaag cctgttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300

tgctgcaatg gtaggaggcc ttttcggaa tatcaaatac aacttggatt tctggaggaa 360

gaatgtgcac atcaatgaca acgtcctgca ctcagctttc gaggtgggca ctcgcaagg 420

ggtctcctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480
aatgateccac aatgggtccac cccacagcag caattttggg tactcgtatg ccaagaggat 540
gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcaccttca ctgctgtcat 600
ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa cttaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660
tggcctcacc cataagggtgc atctggccaa gagtaatggc tcagccttga ctgtttgggg 720
tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctactggac ctagcccggc tcttcatctg 780
ggtcctgcgg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggagc aggaagatga 840
agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaagt 900
cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960
tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020
tgccctgggtc accgacaact atgagcagc cgggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080
tcagctggca atgcccagtc agtaggctgc agtctcatca ttgcttgc aagaactgag 1140
gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccagggggct tcatgcagcc 1200
atccagtagg gcccatgttt gtccatcctc gggggaaggc cagaccaaca ccttgtttgt 1260
ctgcttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggctctg ctgtcccttg tctaga 1316

<210> 4

<211> 321

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 4

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
 20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
 35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
 50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
 65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
 85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
 100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
 115 120 125

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
 130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
 145 150 155 160

His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
 165 170 175

His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
 180 185 190

His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
 195 200 205

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
 210 215 220

Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
 225 230 235 240

Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
 245 250 255

Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp
 260 265 270

Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
 275 280 285

Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
 290 295 300

Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
 305 310 315 320

Lys

<210> 5

<211> 2008

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 5

aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatgtt tccaattctt 60

tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120

tggcgttgga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggt 180

catttggttc gagataatga ccacctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240

gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300
cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgtttttagaa 360
gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420
ctgggaaagg atcatgaaat ctttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctcttg 480
ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660
acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720
agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttgga atctcagaat 840
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgttttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900
gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960
gtggtcgagc tccccattgt agacagctc catcctcgtc ctcttactt acccttggt 1020
gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgacccctg agtgtggtg 1080
gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200
gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260
gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380

agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440
cggggcgtga tcttgatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500
tcattcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560
gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620
attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680
atcattggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aagggtgtcaa cagaaaacta 1740
ggaaaaacag gcctgtaccc ttcctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800
cctacatata ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860
gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980
gaagggtgc tgtgccctca agcccatg 2008

<210> 6

<211> 1728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

atgcgggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60
ttgttatttt atataggtgg tcatttggtt cgagataatg accaccctga tcaactccagc 120
agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240

ggaagagtcc gtgtttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300
aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360
aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420
gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480
aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540
gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600
cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660
ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcattgattg cttatggcac ccagcgaaca 720
ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactggtg gatgggagac tgtgtttaga 780
cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggcctctcca ctggacactg gtcaggatgaa 840
gtaaatgaca aaaacattca agtggtcgag ctccccattg tagacagcct ccatcctcgg 900
cctcettact taccactggc tgttccagaa gaccttcag accgactcct aagagtccat 960
ggtgaccctg cagtgtggtg ggtgtcccag tttgtcaaact acttgattcg tccacaacct 1020
tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140
gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cagcagaat gcaagtggat 1200
aaaaaaagag tatactctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260
tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320
cggtagacag aaaattcact tcgggggtgtg atcctggata tacactttct ctcacaggct 1380

gactttctag tgtgtacttt ttcattccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440
 accctgcac ctagatgcctc tgcgaacttc cattctttgg atgacatcta ctattttgga 1500
 ggccaaaatg cccacaatca gattgctggt tatectcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560
 attccaatgg aacctggaga tatcattggt gtggctggaa accattggga tggttattct 1620
 aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680
 aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

<210> 7

<211> 575

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 7

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His

100	105	110
Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe		
115	120	125
Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu		
130	135	140
Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu		
145	150	155 160
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala		
165	170	175
Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln		
180	185	190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg		
195	200	205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu		
210	215	220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr		
225	230	235 240
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu		
245	250	255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu		
260	265	270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val		
275	280	285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu		
290	295	300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys
 340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510

His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570

<210> 8

<211> 575

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175

Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190

Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
 195 200 205

Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220

His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240

Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255

Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
 260 265 270

Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val
 275 280 285

Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
 340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro

500	505	510
His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile		
515	520	525
Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn		
530	535	540
Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu		
545	550	555
Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys		
565	570	

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Asp His Ala Ile His

1

5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Ser Leu Asn Met Ala Tyr

1

5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

1

5

<210> 15

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu
 100 105 110

Lys

<210> 17

<211> 265

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Single Chain Antibody

<400> 17

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys

20	25	30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
35	40	45
Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu		
50	55	60
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn		
65	70	75
Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser		
85	90	95
Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		
100	105	110
Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
115	120	125
Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
130	135	140
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu		
145	150	155
Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln		
165	170	175
Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln		
180	185	190
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala		
195	200	205
Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
210	215	220

Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val
 225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
 245 250 255

Thr Lys Leu Val Leu Lys Arg Ala Ala
 260 265

<210> 18

<211> 463

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

ccggaattcg acccctcacc atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa 60
 ctacaggtgt ccactcccag gttcagttgc agcagtctga cgctgagttg gtgaaacctg 120
 gggcttcagt gaagatttcc tgcaaggctt ctggctacac cttcactgac catgcaattc 180
 actgggtgaa acagaaccct gaacagggcc tggaatggat tggatatttt tctcccgaa 240
 atgatgattt taaatacaat gagaggttca agggcaaggc cacactgact gcagacaaat 300
 cctccagcac tgcctacgtg cagctcaaca gcctgacatc tgaggattct gcagtgtatt 360
 tctgtaccag atcctgaat atggcctact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct 420
 caggtggcgg aggcagcgga ggcggtggct ccggaactag tcc 463

<210> 19

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

ccggaattcg acccctcacc atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa 60

ctacaggtgt ccaactcccag gttcagttgc agcagtctga cgctgagttg gtgaaacctg 120

gggcttcag

129

<210> 20

<211> 134

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

catttcggg agaaaaatat ccaatccatt ccaggccctg ttcagggttc tgtttcaccc 60

agtgaattgc atggtcagtg aaggtgtagc cagaagcctt gcaggaaatc ttcactgaag 120

ccccaggttt cacc

134

<210> 21

<211> 131

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

ggatattttt ctcccgaaa tgatgatttt aaatacaatg agaggttcaa gggcaaggcc 60

acactgactg cagacaaatc ctccagcact gcctacgtgc agctcaacag cctgacatct 120

gaggattctg c

131

<210> 22

<211> 132

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

ggactagttc cggagccacc gcctccgctg cctccgccac ctgaggagac ggtgactgag 60

gttccttgac cccagtaggc catattcagg gatctggtac agaaatacac tgcagaatcc 120

tcagatgtca gg

132

<210> 23

<211> 536

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 23

ccggaattct ccggaggcgg aggctcggac attgtgatgt cacagtctcc atcctcccta 60

cctgtgtcag ttggcgagaa ggttactttg agctgcaagt ccagtcagag ccttttatat 120

agtggtaatc aaaagaacta cttggcctgg taccagcaga aaccaggga gtctcctaaa 180
ctgctgattt actgggcac cgtagggaa tctggggctc ctgatcgctt cacaggcagt 240
ggatctggga cagatttcac tctctccatc agcagtgtga agactgaaga cctggcagtt 300
tattactgtc agcagtatta tagctatccc ctacagttcg gtgctgggac caagctgggtg 360
ctgaaacggg ccgccgagcc caaatctcct gacaaaactc acacgtgccc accgtgcccc 420
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttctcttcc cccaaaacc caaggacacc 480
ctcatgatct ccgggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgac tagtcc 536

<210> 24

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 24

tctgaattct ccggaggcgg aggctcggac attgtgatgt cacagtctcc atctctcccta 60

cctgtgtcag ttggcgagaa ggttactttg agctgcaagt ccagtcagag ctttttatat 120

agtggtaatc aaaagaacta cttggcctgg 150

<210> 25

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25

cacactgctg atggagagag tgaaatctgt cccagatcca ctgcctgtga agcgatcagg 60
gacccagat tccctagcgg atgccagta aatcagcagt ttaggagact gccctggttt 120
ctgctgttac caggccaagt agttcttttg 150

<210> 26

<211> 149

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

ctctctccat cagcagtgtg aagactgaag acctggcagt ttattactgt cagcagtatt 60
atagctatcc cctcacgttc ggtgctggga ccaagctggt gctgaaacgg gccgccgagc 120
ccaaatctcc tgacaaaact cacacgtgc 149

<210> 27

<211> 149

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 27

ggactagtca cgtccaccac cacgcatgtg acctcagggg tccgggagat catgagggtg 60
tccttgggtt ttggggggaa gaggaagact gacggtcccc ccaggagttc aggtgctggg 120

cacggtgggc acgtgtgagt tttgtcagg

149

<210> 28

<211> 526

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28

caggaaacag ctatgacggt accgaattcg cgaggcaggc agcctggaga gaaggcgtg 60

ggctgcgagg gcgcgagggc gcgagggcag ggggcaaccg gaccccgccc gcatccatgg 120

cgcccgctgc cgtctggggc gcgctggccg tcggactgga gctctgggct gcggcgcacg 180

ccttgcccgc ccaggtggca ttacaccct acgccccgga gcccgggagc acatgccggc 240

tcagagaata ctatgaccag acagctcaga tgtgctgcag caaatgctcg ccgggccaac 300

atgcaaaagt cttctgtacc aagacctgg acaccgtgtg tgactcctgt gaggacagca 360

catacaccca gctctggaac tgggttcccg agtgcttgag ctgtggctcc cgctgtagct 420

ctgaccaggt ggaaactcaa gcctgcactc gggaacagaa ccgcatctgc acctgcagge 480

ccggctggtg ctgcgcgctg agcaagctta ctggccgtcg ttttac

526

<210> 29

<211> 537

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29

caggaaacag ctatgacggt accgctgagc aagcaggagg ggtgccggct gtgcgcgcgc 60
ctgcgcaagt gccgcccggg cttcggcgtg gccagaccag gaactgaaac atcagacgtg 120
gtgtgcaagc cctgtgcccc ggggacgttc tccaacacga cttcatccac ggatatttgc 180
aggccccacc agatctgtaa cgtggtggcc atccctggga atgcaagcat ggatgcagtc 240
tgcacgtcca cgtccccac cggagtatg gcccagggg cagtacactt accccagcca 300
gtgtccacac gatcccaaca cacgcagcca actccagaac ccagcactgc tccaagcacc 360
tccttctgc tccaatggg cccagcccc ccagctgaag ggagcactgg cgacgagccc 420
aaatcttggtg aaaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 480
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggaagctt actggccgtc gttttac 537

<210> 30

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 30

atggcgcccg tcgccgtctg ggccgcgctg gccgtcggac tggagctctg ggctgcggcg 60
cacgccttgc ccgccaggt ggcatttaca ccctacgcc cggagcccgg gagcacatgc 120
cggctcagag aatactatga ccagacagct 150

<210> 31

<211> 135

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA

<400> 31

agacggcgac gggcgccatg gatgcgggcg gggtcgggtt gccccctgcc ctgcgcacct 60

cgcgcacctg cagcccagcg ccttctctcc aggctgcctg cctgcggaat tcggtaccgt 120

catagctgtt tcctg

135

<210> 32

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequense: Synthetic DNA

<400> 32

gaactgggtt cccgagtgt tgagctgtgg ctcccgctgt agctctgacc aggtggaaac 60

tcaagcctgc actcggaac agaaccgat ctgcacctgc aggcccggt ggtactgcgc 120

gctgagcaag cttactggcc gtcgttttac

150

<210> 33

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence; Synthetic DNA

<400> 33

gcactcggga acccagttcc agagctgggt gtagtgctg tctcacagg agtcacacac 60

ggtgtccgag gtcttggtac agaagacttt tgcattgttg cccggcgagc atttgctgca 120

gcacatctga gctgtctggt catagtattc 150

<210> 34

<211> 149

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

ctgtgccccg gggacgttct ccaacacgac ttcattccac gatatttgca ggccccacca 60

gatctgtaac gtggtggcca tccctgggaa tgcaagcatg gatgcagtct gcacgtccac 120

gtccccacc eggagtatgg ccccagggg 149

<210> 35

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35

gaacgtcccc ggggcacagg gcttgacac cacgtctgat gtttcagttc ctggtctggc 60
cacgccgaag cccgggcggc acttgccag cggcgcgcac agccggcacc cctcctgctt 120
gtcagcgggt accgtcatag ctgtttcctg 150

<210> 36

<211> 145

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36

agctgaaggg agcactggcg acgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc 60
gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa 120
ggaagcttac tgccgctcgt ttac 145

<210> 37

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37

gccagtgtc ccttcagctg gggggctggg gccattggg agcaggaagg aggtgcttgg 60
agcagtgtc ggttctggag ttggctgcgt gtgttgggat cgtgtggaca ctggctgggg 120
taagtgtact gccctgggg ccatactccg 150

<210> 38

<211> 452

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 38

caggaaacag ctatgacggt accgaattcc gacgagccat ggttgctggg agcgacgcgg 60

ggcgggccct gggggtcctc agcgtggtct gcctgctgca ctgctttggt ttcattcagct 120

gtttttccca acaaatatat ggtgttggtg atgggaatgt aactttccat gtaccaagca 180

atgtgccttt aaaagaggtc ctatggaaaa aacaaaagga taaagttgca gaactggaaa 240

attctgaatt cagagctttc tcattcttta aaaatagggt ttatttagac actgtgtcag 300

gtagcctcac tatctacaac ttaacatcat cagatgaaga tgagtatgaa atggaatcgc 360

caaatattac tgataccatg aagttctttc tttatgtcga caaaactcac acatgcccac 420

cgtgccccagc acctgactgg ccgtcgtttt ac 452

<210> 39

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

gtttcatcag ctgtttttcc caacaaatat atggtgttgt gtatgggaat gtaactttcc 60

atgtaccaag caatgtgcct ttaaaagagg tcctatggaa aaaacaaaag gataaagttg 120

cagaactgga aaattctg 138

<210> 40

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

gggaaaaaca gctgatgaaa ccaaagcagt gcagcaggca gaccacgctg aggaccccca 60

gggcccgcgc cgcgtcgctc ccagcaacca tggctcgctg gaattcggtg ccgtcatagc 120

tgtttcctg 129

<210> 41

<211> 133

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 41

cttaacatca tcagatgaag atgagtatga aatggaatcg ccaaatacta ctgataccat 60

gaagttcttt ctttatgtcg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgactg 120

gccgtcgttt tac 133

<210> 42

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

catcttcac tcgatgatgtt aagttgtaga tagtgaggct acctgacaca gtgtctaaat 60

aaaccctatt tttaaaagat gagaaagctc tgaattcaga atttccagt tctgcaac 118

<210> 43

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43

gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 44

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 44

taaataagaat tcggcatcat gtggcagctg ct 32

<210> 45

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 45

aataaaggat cctgggggtca tttgtcttga gggt

34

<210> 46

<211> 788

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(774)

<400> 46

gaattcggca tc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt cta 51

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu

1

5

10

gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg ttc 99

Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe

15

20

25

ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act ctg 147

Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu

30

35

40

45

aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg ttt 195

Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe

50

55

60

cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att gac 243

His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp
 65 70 75

gct gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac ctc 291
 Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu
 80 85 90

tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg ctg 339
 Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu
 95 100 105

ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att cac 387
 Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His
 110 115 120 125

ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca tat 435
 Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr
 130 135 140

tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac ttc 483
 Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe
 145 150 155

tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc agg 531
 Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg
 160 165 170

ggg ctt ttt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc acc 579
 Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr
 175 180 185

atc act caa ggt ttg gca gtg tca acc atc tca tca ttc ttt cca cct 627
 Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro
 190 195 200 205

ggg tac caa gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca gtg 675
 Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val
 210 215 220

gac aca gga cta tat ttc tct gtg aag aca aac att cga agc tca aca 723
 Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr
 225 230 235

aga gac tgg aag gac cat aaa ttt aaa tgg aga aag gac cct caa gac 771
 Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp
 240 245 250

aaa tgaccccagg atcc 788
 Lys

<210> 47
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln

100	105	110
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys		
115	120	125
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn		
130	135	140
Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro		
145	150	155 160
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe		
165	170	175
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln		
180	185	190
Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln		
195	200	205
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly		
210	215	220
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp		
225	230	235 240
Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys		
245	250	

<210> 48

<211> 788

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(774)

<400> 48

```

gaattcggca tc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt cta 51
      Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu
          1                               5                               10

ggt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg ttc 99
Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe
      15                               20                               25

ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act ctg 147
Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu
      30                               35                               40                               45

aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg ttt 195
Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe
          50                               55                               60

cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att gac 243
His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp
          65                               70                               75

gct gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac ctc 291
Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu
          80                               85                               90

tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg ctg 339
Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu
          95                               100                               105

ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att cac 387
Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His
      110                               115                               120                               125

ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca tat 435
Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr
          130                               135                               140

```

tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac ttc 483
 Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe
 145 150 155

tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc agg 531
 Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg
 160 165 170

ggg ctt gtt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc acc 579
 Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr
 175 180 185

atc act caa ggt ttg gca gtg tca acc atc tca tca ttc ttt cca cct 627
 Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro
 190 195 200 205

ggg tac caa gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca gtg 675
 Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val
 210 215 220

gac aca gga cta tat ttc tct gtg aag aca aac att cga agc tca aca 723
 Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr
 225 230 235

aga gac tgg aag gac cat aaa ttt aaa tgg aga aag gac cct caa gac 771
 Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp
 240 245 250

aaa tgaccccagg atcc 788
 Lys

<210> 49

<211> 254

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
 145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
 225 230 235 240

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
 245 250

<210> 50

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 50

tggtgatcc tgtcaatgat gatgatgatg atgacctga gtgatggtga t 51

<210> 51

<211> 620

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(609)

<400> 51

gaattcgga tc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt cta 51

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu

1

5

10

gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg ttc 99

Val	Ser	Ala	Gly	Met	Arg	Thr	Glu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Val	Val	Phe	
15						20					25					
ctg	gag	cct	caa	tgg	tac	agg	gtg	ctc	gag	aag	gac	agt	gtg	act	ctg	147
Leu	Glu	Pro	Gln	Trp	Tyr	Arg	Val	Leu	Glu	Lys	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	
30				35					40						45	
aag	tgc	cag	gga	gcc	tac	tcc	cct	gag	gac	aat	tcc	aca	cag	tgg	ttt	195
Lys	Cys	Gln	Gly	Ala	Tyr	Ser	Pro	Glu	Asp	Asn	Ser	Thr	Gln	Trp	Phe	
			50					55					60			
cac	aat	gag	agc	ctc	atc	tca	agc	cag	gcc	tgc	agc	tac	ttc	att	gac	243
His	Asn	Glu	Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Ile	Asp	
			65					70					75			
gct	gcc	aca	gtc	gac	gac	agt	gga	gag	tac	agg	tgc	cag	aca	aac	ctc	291
Ala	Ala	Thr	Val	Asp	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Thr	Asn	Leu	
	80						85					90				
tcc	acc	ctc	agt	gac	ccg	gtg	cag	cta	gaa	gtc	cat	atc	ggc	tgg	ctg	339
Ser	Thr	Leu	Ser	Asp	Pro	Val	Gln	Leu	Glu	Val	His	Ile	Gly	Trp	Leu	
	95					100					105					
ttg	ctc	cag	gcc	cct	cgg	tgg	gtg	ttc	aag	gag	gaa	gac	cct	att	cac	387
Leu	Leu	Gln	Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Phe	Lys	Glu	Glu	Asp	Pro	Ile	His	
110					115				120					125		
ctg	agg	tgt	cac	agc	tgg	aag	aac	act	gct	ctg	cat	aag	gtc	aca	tat	435
Leu	Arg	Cys	His	Ser	Trp	Lys	Asn	Thr	Ala	Leu	His	Lys	Val	Thr	Tyr	
			130					135					140			
tta	cag	aat	ggc	aaa	ggc	agg	aag	tat	ttt	cat	cat	aat	tct	gac	ttc	483
Leu	Gln	Asn	Gly	Lys	Gly	Arg	Lys	Tyr	Phe	His	His	Asn	Ser	Asp	Phe	
		145						150					155			
tac	att	cca	aaa	gcc	aca	ctc	aaa	gac	agc	ggc	tcc	tac	ttc	tgc	agg	531
Tyr	Ile	Pro	Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Cys	Arg	
	160						165					170				

ggg ctt ttt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc acc 579
 Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr
 175 180 185

atc act caa ggt cat cat cat cat cat cat tgacaggatc c 620
 Ile Thr Gln Gly His His His His His His
 190 195

<210> 52

<211> 199

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys

115 120 125
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140
 Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
 145 150 155 160
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe
 165 170 175
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190
 Gly His His His His His His
 195

<210> 53
 <211> 620
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (13)..(609)

<400> 53
 gaattcggca tc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt cta 51
 Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu
 1 5 10

gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg ttc 99
 Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe
 15 20 25

ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act ctg 147
 Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu

30	35	40	45	
aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg ttt				195
Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe				
	50	55	60	
cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att gac				243
His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp				
	65	70	75	
gct gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac ctc				291
Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu				
	80	85	90	
tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg ctg				339
Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu				
	95	100	105	
ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att cac				387
Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His				
110	115	120	125	
ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca tat				435
Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr				
	130	135	140	
tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac ttc				483
Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe				
	145	150	155	
tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc agg				531
Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg				
	160	165	170	
ggg ctt gtt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc acc				579
Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr				
175	180	185		

atc act caa ggt cat cat cat cat cat cat tgacaggatc c

620

Ile Thr Gln Gly His His His His His His

190

195

<210> 54

<211> 199

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala

1

5

10

15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro

20

25

30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln

35

40

45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu

50

55

60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr

65

70

75

80

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu

85

90

95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln

100

105

110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys

115

120

125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn

130

135

140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
 145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190

Gly His His His His His His
 195

<210> 55

<211> 9196

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 55

tctagaccag gctggtctcg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgtg 60
 ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tatttttgaa tattgtgata 120
 atttacatta taattgtaag taaaaatttt cagcctat ttgttatacat ttttgcgtaa 180
 attattcttt ttgaaagtt ttgttgcca taatagtcta gggaacata aagttataat 240
 ttttgtctat gtatttgc atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaata 300
 ggtatgtaat agcttcaaca tgtggtatga tagaattttt cagtgtata taagttgtta 360
 cagcaaagtg ttattaattc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420
 atccttaagc tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480
 ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540
 ggtccaagaa tggagttatg taaggggaat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600

gatgagtctt gtgaccttag tttctttaaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660
ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720
tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tttttttttt gccacatgca gcttgtcctt 780
atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840
aaagttaggt attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900
cccaccacct ccagagtggg aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080
agtagacaag acattaaata ttccttgga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaaata 1140
atagtcagt agtatacccc tccccattc tatattttag cagaaatcag aataaatggt 1200
gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttcttg ggtttttgtg catttaaagt 1260
caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga tttttggaat cccctttctt 1320
cagcttttct atttaatctc ttaatgataa ttaatttgt ggccatgtgg tcaaagtata 1380
tagccttgta tatgtaaatg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440
tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500
tttcatatat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560
tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttgag 1620
tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgttgta gccttctttt ggaattttta 1680
ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740

tacatcatat ccacctgtaa ttattagtg ttttaaatat atttgaaaa ataatggtct 1800
ggtttgatcc atttgaacct ttgatgttt ggtgtggttg ccaattgggt gatggttatg 1860
ataacctttg cttctctaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920
gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980
ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040
tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100
cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatac 2160
aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220
agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280
ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340
gcacaggaca agaaagctgc ctccttgtat caccaggaag atctttttgt aagagtcatac 2400
acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460
attttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520
aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttcct ggcgttgat 2580
tatgttcatt ctttttgcct gggggacott attgttttat ataggtggtc atttggttcg 2640
agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700
gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760
aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgaccttt aggtataggg tctcagtctg 2820
ctgttgaaaa atataatttc tacaaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880

ttttttaaag tcagtgatac atctatatag tcaatatagg tttacatagt tgcaatctta 2940
ttttgcatat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000
attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgctcatt aaatTTTTTT 3060
attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120
tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtgc tccggaatgt gggtaattat 3180
tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcac cagttgtttg 3240
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300
ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360
tctaagaatg atcatgtgta cagtgcctac tgtcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420
tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtgggatta 3480
agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540
tagagaggat gccttctggc tctccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600
cttttagaac tcagatgttt catatggtat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660
aaatgtctat ggatgataat gttgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720
tcctcggtgt gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780
agtcagggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagtccat 3840
caggaggagg tttgaaagt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900
gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaatTT 3960
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtac 4020

tgttttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080
aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140
tccgaactct tatcttccta agctgaaaac agaaaaagca atgaccaga aaattttatt 4200
taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc ttttcccttt tataatttag 4260
gtcctgaat aatcactgaa ttttctccat gttccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320
tccttttttc ttaccacaaa gtatcttggt tttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380
aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440
agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagttggcta gggcttctta ttggctagct 4500
ctgtcttaat tattaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatcttac 4560
caaggaaagg gtccaggagc ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtga gaggagagag 4620
cgatttcta tttgtctctg cttatcttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680
ggccaatcag ccaatcagtg ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740
gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800
taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860
ttgtgtcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatctttttt taagggacaa 4920
agagtttatt cagattacat ttttaaggta taatgtatga ttgcaagggt atcaacatgg 4980
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040
gatgcatgca ttcctgtgct cagctcactt ttcctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100
tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160

catctctcca gtccctcata tggctcttta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220
aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaagc tgatataata 5280
aatgtaaata caatctagaa catttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340
gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400
tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttatth taaagctaag acatgaatga 5460
tggacatgct tgtagcatt tagacttttt tecttactat aattgagcta gtatthttgt 5520
gtcagtttg atatctgtha attcagataa atgtaatagt aggtaatttc tttgtgataa 5580
aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagthttta agattcagaa 5640
caataattht caaaagcagt taccacactt tccaaataca atctgcagtt ttcttgatat 5700
gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat thtaaaatag ctatttactc ttgattthtt 5760
thtcaaattt aggctagttc actagtthtg tgtaaggtha tggtgcaaa catctthgac 5820
tcttggttag ggaatccagg atgattthac tgtthggcca aaatcttgth ccattctggg 5880
thtcttctct atctaggttag ctagcacaaag thaaaggtht ggtagthttg gaaggctctc 5940
aggthataat thctatattc tgtatthttt tectctgtca tatatttgct thctgtthta 6000
thgattthcta ctgthagtht gatacttact thctthacact thctthggga thtattthgc 6060
tgttctaaga thtcttagca agthcatatc actgattthta acagthgctt cththgthaat 6120
atagactgaa tgcccttht thgaaatgct tgggacaga aactcagatt tgaactthtc 6180
thththtaata thtccatcaa gththaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240
gaaatgctth gaaatctgaa actththtag thgataaagct tccctththaa thaatththgt 6300

ttctatattt ttgacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360
atTTTTtTgt ttgatctggt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420
tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatttttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480
attatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgccttttgt 6540
tggtgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaatt tatatagcat 6600
gttgtttgtt aggtagtga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaaa 6660
atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg cttgctgtct cctatcggtt 6720
ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt ttgtgtgtt gaatactaac tccgtactat 6780
cttgttttct gtgaattaac cctttttcaa aggtttcttt tctttttttt ttttaaggac 6840
aacaagttaa ttcagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900
ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960
tgaattaatg catgcattcc tgtggtcagc tcacttttcc tattcttaga tagtctagga 7020
tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcatatc cacttacttc agttcatgca 7080
atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140
ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200
gtaaatataa tgaaaatggt gattatcacc ataattcacc tgtatccctt tgttattgta 7260
gattttgtga agttcctatt caagtccttg ttccttcctt aaaaacctgt tttttagtta 7320
aataggtttt ttagtggtcc tgtctgtaaa tactttttta aagttagata ttattttcaa 7380
gstatgtctc ccagtctttg gcttgatatt tcaccccttc aatacatata tttttgtaat 7440

ttatTTTTTT tatttaaatt agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500
tccctccctt cctcccttgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctcccc 7560
aggaaggggtg aggccctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgtcatatca tttggagcag 7620
ggcctagacc ctccccagtg tgtctaggtt gagagagtat ccctctatgt ggagagggct 7680
cccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740
tgtccggacc tccaaactga cttcctcctt cagggagtct ggaacagttc tatgctggtt 7800
tcccagatat cagtctgggg tccatgagca accccttggt caggtcagtt gtttctgtag 7860
gtttccccag cccggtcttg acccctttgc tcatacttc tccctctctg caactggatt 7920
ccagagttca gctcagtgtt tagctgtggg tgtctgcac tgcttccac agctactgga 7980
tgagggtctt aggatggcat ataaggtagt catcagttc attatcagag aagggtttt 8040
aaggtagcct cttgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100
acagtgacag aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtgggtgga tcccttttct 8160
tgctctcac cgttcctccc ctgactagat cttcctgtc cctcatgtcc tctctcccc 8220
tcccttctc cccttctctt tcttctaact cctctcccc tccaccaag atccccatta 8280
gcttatgaga tcttgtcctt atttagcaa aacctttttg gctataaaat taattaattt 8340
aatatgctta tatcaggttt atttggcta gtatttgtat gtgtttggtt agtgttttta 8400
accttaattg acatgtatcc ttatatthag acacagattt aaatattga agtttttttt 8460
tttttttttt ttaaagattt atttattttt tatgtcttct gcctgcatgc cagaagaggg 8520
caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580

gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640
gtttctttta aagaggatag cagtgcata ttttccctt tgaccaatga ctctacctt 8700
actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttate 8760
ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcatc tcttattttt gtctgttgga ttatataggc 8820
ttttattttt ctgtttttac agtaagtat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880
gtgttgacta catgtatgtc tgtgcacat gtgctgacct ggtcttgccc agaagaaggt 8940
gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000
aaaccccagc tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtc tctcttcaag 9060
caggtgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgatc tctagcacc 9120
atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180
aggatcccaa gagtc 9196

<210> 56

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 56

gagacttcag cccacttcaa ttattggc

28

<210> 57

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 57

cttgtgtgac tcttaactct cagag

25

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 58

gaggccactt gtgtagcgcc aagtg

25

<210> 59

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 59

ccctcgagat aacttcgtat agc

23

<210> 60

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 60

ggtaggcctc actaactg

18

<210> 61

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 61

catagaaaca agtaacaaca gccag

25

<210> 62

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 62

gtgagtccat ggctgtcact g

21

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 63

cctgacttgg ctattctcag

20

<210> 64

<211> 235

<212> PRT

<213> Homo. sapiens

<400> 64

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro

130

135

140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
 145 150 155 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
 165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
 180 185 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
 195 200 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
 210 215 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp
 225 230

<210> 65

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
 1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
 20 25 30

Asp Lys Val Ala Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser
 35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
 50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
 65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val
 85 90

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Glu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1

5

10

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1

5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

1

5

<210> 72

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Pro
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 73

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Ala
 100 105

<210> 74

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Single Chain Antibody Fv

<400> 74

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Pro			
	100	105	110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
	115	120	125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser			
	130	135	140
Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala			
	145	150	155
Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr			
	165	170	175
Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val			
	180	185	190
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr			
	195	200	205
Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	210	215	220
Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Glu Leu			
	225	230	235
			240
Lys Arg Ala Ala			

<210> 75

<211> 515

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Bispecific Single Chain Antibody

<400> 75

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Pro
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser
130 135 140

Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala
145 150 155 160

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr

165	170	175
Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val		
180	185	190
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr		
195	200	205
Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln		
210	215	220
Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Glu Leu		
225	230	235
Lys Arg Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
245	250	255
Gly Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln		
260	265	270
Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys		
275	280	285
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His		
290	295	300
Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe		
305	310	315
Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys		
325	330	335
Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu		
340	345	350
Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser		
355	360	365

Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu
 405 410 415

Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly
 420 425 430

Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 435 440 445

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro
 450 455 460

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile
 465 470 475 480

Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 485 490 495

Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys
 500 505 510

Arg Ala Ala
 515

<210> 76

<211> 515

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amino Acid Sequence of Bispecific
 Single Chain Antibody

<400> 76

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser
130 135 140

Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
145 150 155 160

Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser
180 185 190

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 195 200 205

Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 225 230 235 240

Val Leu Lys Arg Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 245 250 255

Gly Gly Gly Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 260 265 270

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 275 280 285

Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 290 295 300

Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala
 305 310 315 320

Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 325 330 335

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 340 345 350

Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 355 360 365

Arg Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Pro Gly
 370 375 380

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile
 405 410 415

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 420 425 430

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 435 440 445

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 450 455 460

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 465 470 475 480

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 485 490 495

Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 500 505 510

Arg Ala Ala
 515

<210> 77

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 77

gaattcgacc cctcaccatg gaatggagct gggctcttct cttcttcctg tcagtaacta 60

ccggtgggga tccccactag tcctccgga

89

<210> 78

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 78

aattcgaccc ctcaccatgg aatggagctg ggtctttctc ttcttcctgt cagtaactac 60

cggtaggggat cccactagt cct

83

<210> 79

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 79

ccggaggact agtggggatc cccaccggta gttactgaca ggaagaagag aaagaccag 60

ctccattcca tggtagggg tcg

83

<210> 80

<211> 411

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 80

gcgaccggtg tccactccca ggtccaactg caggagtcag gaggaggctt agtgcagcct 60
ggagggtccc tgaaactctc ctgtgcagcc tctggattca ctttcagtag ctatggcatg 120
tcttgggttc gccagactcc agacaagagg ctggagttgg tcgcaacat taatagtaat 180
ggtggttagca cctattatcc agacagtgtg aagggccgat tcaccatctc cagagacaat 240
gccaagaaca ccctgtacct gcaaatgagc agtctgaagt ctgaggacac agccatgtat 300
tactgtgcaa gagatcgga tggttacgac gagggatttg actactgggg cccagggacc 360
acggtcaccg tctctcagg tggcggaggc agcggaggcg gtggatcccg c 411

<210> 81

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 81

gcgaccggtg tccactccca ggtccaactg caggagtcag gaggaggctt agtgcagcct 60
ggagggtccc tgaaactctc ctgtgcagcc tctggattca ctttcagtag ctatggcatg 120

<210> 82

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 82

cggcccttca cactgtctgg ataatagggtg ctaccacat tactattaat ggttgcgacc 60

aactccagcc tcttgtctgg agtctggcga acccaagaca tgccatagct actgaaagtg 120

<210> 83

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 83

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 60

ctgcaaata gacgtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagatc 118

<210> 84

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 84

cgcgcatcca ccgcctccgc tgcctccgcc acctgaggag acggtgaccg tggctccctg 60

gccccagtag tcaaatacct cgtcgtaacc atccgatct ctgacacagt aatacatg 118

<210> 85

<211> 386

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 85

gcgggatccg gtggcggagg ctggacatt gagctgaccc aatctccatc aatcatgtct 60
gcattctccag gggagaaggt caccatgacc tgcagtgccca gctcaagtgt aagttacatg 120
cactggtacc agcagaagtc aggcacctcc cccaaaagat ggatttatga cacatccaaa 180
ctggcttctg gagtccctgc tcgcttcagt ggcagtgggt ctgggacctc ttactctctc 240
acaatcagca gcatggaggc tgaagatgct gccacttatt actgccagca gtggagtagt 300
aaccaccca cgttcggagg gcggaccaag ctggaactga aacgggccgc cgagcccaaa 360
tctcctgaca aaactcacac gtggcg 386

<210> 86

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 86

gcgggatccg gtggcggagg ctggacatt gagctgaccc aatctccatc aatcatgtct 60
gcattctccag gggagaaggt caccatgacc tgcagtgccca gctcaagtg 109

<210> 87

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 87

gcagggactc cagaagccag ttg gatgtg tcataaatcc atcttttggg ggaggtgcct 60

gacttctgct ggtaccagt catgtaactt acacttgagc tggcactgca g 111

<210> 88

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 88

ctggcttctg gaggccctgc tcgcttcagt ggcagtgggt ctgggacctc ttactctctc 60

acaatcagca gcatggaggc tgaagatgct gccacttatt actgccagca gtgg 114

<210> 89

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 89

cgccacgtgt gaggtttgc aggagatttg ggctcggcgg cccgtttcag ttccagcttg 60

gtccgccctc cgaacgtggg tgggttacta ctccactgct ggcagtaata agtg 114

<210> 90

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 90

gcgggatccg gtggcggagg ctggacatt gagctgaccc aatctccatc aatcatgtct 60

gcatctccag gggagaaggt caccatgacc tgcagtgcc a gctcaagtgt aagttacatg 120

cactggtacc agcagaagtc aggcacctcc cccaaaagat ggatttatga cacatccaaa 180

ctggcttctg gaggccctgc tcgcttcagt ggcagtgggt ctgggacctc ttactctctc 240

acaatcagca gcatggaggc tgaagatgct gccacttatt actgccagca gtggagtagt 300

aaccaccca cggtcggagg gcggaccaag ctggaactga aacgggccgc cgggtggcgga 360

ggcagcggag gcggtggtag cgggtggcgga actagtgcg 399

<210> 91

<211> 127

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 91

cgcactagtt ccgccaccgc taccaccgcc tccgctgcct ccgccaccgg cggcccgttt 60

cagttccagc ttggtccgcc ctccgaacgt ggggtgggtta ctactccact gctggcagta 120

ataagtg 127

<210> 92

<211> 812

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 92

tttactagtg gtggcggagg cagcggaggc ggtggtagcc aggttcagtt gcagcagtct 60
gacgctgagt tgggtgaaacc tggggcttca gtgaagattt cctgcaaggc ttctggctac 120
accttcactg accatgcaat tcaactgggtg aaacagaacc ctgaacaggg cctggaatgg 180
attggatatt tttctcccg gaaatgatgat tttaaataca atgagaggtt caagggaag 240
gccacactga ctgcagacaa atcctccagc actgcctacg tgcagctcaa cagcctgaca 300
tctgaggatt ctgcagtgt tttctgtacc agatccctga atatggccta ctgggggtcaa 360
ggaacctcag tcaccgtctc ctccaggtggc ggaggcagcg gaggcgggtg ctccggaggc 420
ggaggctcgg acattgtgat gtcacagtct ccctcctccc tacctgtgtc agttggcgag 480
aaggttactt tgagctgcaa gtccagtcag agccttttat atagtggtaa tcaaaagaac 540
tacttggcct ggtaccagca gaaaccaggg cagtctccta aactgctgat ttactgggca 600
tccgctaggg aatctggggg ccctgatcgc ttcacaggca gtggatctgg gacagatttc 660
actctctcca tcagcagtgt gaagactgaa gacctggcag tttattactg tcagcagtat 720
tatagctatc ccctcacgtt cgggtgctggg accaagctgg tgctgaaacg ggccggcgag 780
cccaaattct ctgacaaaac tcacacgtgc cc 812

<210> 93

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 93

tttactagtgtgtggcggaggcagcggaggcgtggtagccaggttcagttgcagcagttct60

gacg

64

<210> 94

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 94

gggcacgtgtgagttttgtcagg

23

<210> 95

<211> 817

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 95

cttcctgtcagtaactaccgtgtccactccaggttcagttgcagcagctgacgctga60

gttggtgaaa cctggggcctt cagtgaagat ttcctgcaag gcttctggct acaccttcac 120
 tgaccatgca attcactggg tgaacacagaa ccctgaacag ggcctggaat ggattggata 180
 tttttctccc ggaaatgatg attttaata caatgagagg ttcaaggga aggccacact 240
 gactgcagac aaatcctcca gcactgccta cgtgcagctc aacagcctga catctgagga 300
 ttctgcagtg tatttctgta ccagatccct gaatatggcc tactggggtc aaggaacctc 360
 agtcaccgtc tctcagggtg gcggaggcag cggaggcggg ggctccggag gcggaggctc 420
 ggacattgtg atgtcacagt ctccatctc cctacctgtg tcagttggcg agaaggttac 480
 tttagctgc aagtccagtc agagcctttt atatagtggg aatcaaaaaga actacttggc 540
 ctggtaccag cagaaaccag ggcagtctcc taaactgctg atttactggg catccgctag 600
 ggaatctggg gtccctgatc gcttcacagg cagtggatct gggacagatt tcactctctc 660
 catcagcagt gtgaagactg aagacctggc agtttattac tgtcagcagt attatagcta 720
 tcccctcacg ttcggtgctg ggaccaagct ggtgctgaaa cgggccgccg gtggcggagg 780
 cagcggaggc ggtggttagcg gtggcggaac tagtaaa 817

<210> 96

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 96

cttctgtca gtaactaccg gtgtccactc ccaggttcag

40

<210> 97

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 97

tttactagtt ccgccaccgc taccaccgcc tccgtgcct ccgccaccgg cgccccgttt 60

cagcaccagc ttggtcccag caccg

85

<210> 98

<211> 806

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 98

tttactagtg gtggcggagg cagcggaggc ggtggtagcc aggtccaact gcaggagtca 60

ggaggaggct tagtgcagcc tggagggtcc ctgaaactct cctgtgcagc ctctggattc 120

actttcagta gctatggcat gtcttgggtt cgccagactc cagacaagag gctggagttg 180

gtcgcaacca ttaatagtaa tggtagtagc acctattatc cagacagtgt gaagggccga 240

ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac accctgtacc tgcaaatgag cagtctgaag 300

tctgaggaca cagccatgta ttactgtgca agagatcggg atggttacga cgagggattt 360

gactactggg gcccaggac caggtcacc gtctcctcag gtggcggagg cagcggaggc 420

ggtggatccg gtggcggagg ctggacatt gagctgacce aatctccatc aatcatgtct 480
gcatctccag gggagaaggt caccatgacc tgcagtgcc a gctcaagtgt aagttacatg 540
cactggtacc agcagaagtc aggcacctcc cccaaaagat ggatttatga cacatccaaa 600
ctggcttctg gagtccttgc tcgcttcagt ggcagtgggt ctgggacctc ttactctctc 660
acaatcagca gcatggagge tgaagatgct gccacttatt actgccagca gtggagtagt 720
aaccaccca cgttcggagg gcggaccaag ctggaactga aacgggccgc cgagcccaaa 780
tctcctgaca aaactcacac gtgccc 806

<210> 99

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 99

tttactagtgt gtggcggagg cagcggaggc ggtggtagcc aggtccaact gcaggagtca 60

ggagg

65

<210> 100

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 100

acaacggaat tcaagcctgt agcacatggt gtagc

35

<210> 101

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 101

ggcgggatcc tcacagggca atgatcccaa agtagacct

39

<210> 102

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 102

aacaacggaa ttgacccac ggctccacc tctctcccct ggaaaggaca ccatgagcac 60

tgaaagcatg atccgggacg tggagctggc cgaggaggc

99

<210> 103

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 103

tgccacgatac aggaaggaga agaggctgag gaacaagcac cgcctggagc cctggggccc 60

ccctgtcttc ttggggagcg cctcctcggc cagctccac

99

<210> 104

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 104

tctccttctt gatcgtggca ggcgccacca cgctcttctg cctgctgcac tttggagtga 60

tcggccccc gaggaagag ttccccaggg acctctctc

99

<210> 105

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 105

ttggctacaa catgtgctac tgcctgggcc agagggtga ttagagagag gtccctgggg 60

aac

63

<210> 106

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 106

aacaacggaa ttgacccac

20

<210> 107

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 107

ttggctacaa catgtgctac

20

<210> 108

<211> 717

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (46)..(708)

<400> 108

gaattcgacc cacggctcca ccctctctcc cctggaaagg acacc atg agc act gaa 57

Met Ser Thr Glu

1

agc atg atc cgg gac gtg gag ctg gcc gag gag gcg ctc ccc aag aag 105

Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala Leu Pro Lys Lys

5

10

15

20

aca ggg ggg ccc cag ggc tcc agg cgg tgc ttg ttc ctc agc ctc ttc 153
 Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe Leu Ser Leu Phe
 25 30 35

tcc ttc ctg atc gtg gca ggc gcc acc acg ctc ttc tgc ctg ctg cac 201
 Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe Cys Leu Leu His
 40 45 50

ttt gga gtg atc ggc ccc cag agg gaa gag ttc ccc agg gac ctc tct 249
 Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser
 55 60 65

cta atc agc cct ctg gcc cag gca gta gca cat gtt gta gca aac cct 297
 Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
 70 75 80

caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg gcc aat gcc ctc 345
 Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
 85 90 95 100

ctg gcc aat ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg gtg gtg cca tca 393
 Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
 105 110 115

gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc ctc ttc aag ggc caa ggc 441
 Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
 120 125 130

tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc agc cgc atc gcc 489
 Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
 135 140 145

gtc tcc tac cag acc aag gtc aac ctc ctc tct gcc atc aag agc ccc 537
 Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
 150 155 160

tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct gag gcc aag ccc tgg tat gag 585
 Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu

165 170 175 180
 ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag aag ggt gac cga ctc 633
 Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
 185 190 195
 agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt gcc gag tct ggg 681
 Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
 200 205 210
 cag gtc tac ttt ggg atc att gcc ctg tgaggatcc 717
 Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 215 220

<210> 109
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 109
 Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
 20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
 35 40 45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
 50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Ala His Val
 65 70 75 80

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 85 90 95

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 100 105 110

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 115 120 125

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 130 135 140

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 145 150 155 160

Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 165 170 175

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 180 185 190

Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 195 200 205

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 210 215 220

<210> 110

<211> 383

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 110

gttaactggg gctcttttaa acctgaatt tttctaaatc cccacctcca agagtttggt 60

ttaaactgat ttttttaatg aatacctttt gaagaataga gcattgtctc atcatgcaaa 120

gcttctcagg gattcagcta gcatgttgaa gaaacataag ggtgttaaatt tgtttgtcac 180

aagtgtgaa taaatattga cgtagtcttc agctattcta tactggaagt agatgatatt 240
ctcattggaa attctgttag gaagtaacce ttcttgtctt cttacctgca tagaatccca 300
ggatataaaa cttgtgcttg tgccecttgc cattgtctct cactgggtggc ctttattgca 360
tctcatatct gccttctctt tcc 383

<210> 111

<211> 564

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 111

taagaattcc tgtgcccgag tgtatgtgag gctctctgca ggtgtaggga tgtttctgct 60
ttctttctgc acatgcttca cagctgaagt cctttgggtg tgagattgac attcagatag 120
actaaagtga ctggacttgt tgggaaacat actgtatgca ttattgccgt tgcctccagg 180
tgaaattaac acctcattca ccaatccctg ttcacccaaa ctttctaccc acatcacttt 240
aaatagaaat tagacceaat atgactcctt ttttcctaag ctgtttatag agattgtgct 300
ggagcagtga gcttttgtgt ttgtttgttt gttttgtaat tttcccatg aaaatttctc 360
taaactcaaa cctaagaggg aaaaaaaaaa aacagactta tatgtgccac acttgtaaaa 420
aaaaatcatg aaagatgtat atgatatttt taaacagttt gaatattaag atcacaattt 480
ctattttaaa aacaatcttg ttttacatat caatcaccca attcccttgc ctteccatcc 540
tcccattccc cccactgac cccc 564

<210> 112

<211> 120

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 112

atgaatgttc attctttggg tatatgccca agagtagaat tgctaaatat tgaggtagac 60

tgattcccat tttcttgagg agtcgccata ttgatttcca aagtgactgt acaagttaac 120

<210> 113

<211> 274

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 113

aggcactagg taaatatttt tgaagaaaga atgagtatct cctatttcag aaaaactttt 60

attgacttaa atttaggata tcagaattag aaaacagtaa aaatttatag gagagttttt 120

aatgaatgtt attttaaggt tccatacaaa tagtaattaa aacttacaca aactatttgt 180

agtaatgatt cagtctggta taccctgatg agcattatac acttttaaatt tctttttgta 240

aattttttta ttagttcaaa ttaggaacaa gctt 274

原本(出願用)
[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0-1	様式 PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、右記によって作成された。	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.163)
0-2	国際出願番号	PCT/JP 2004/015325
0-3	出願人又は代理人の書類記号	1613

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	22
1-2	行	18
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6
1-3-3	寄託の日付	2003年 09月 30日 (30. 09. 2003)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08499
1-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則28 (3) の規定に基づき、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料分譲されることを可能とすることを出願人は希望する (Rule 28 (4) EPC)
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
2-1	記載頁	22
2-2	行	19
2-3	寄託の表示	
2-3-1	寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
2-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6
2-3-3	寄託の日付	2003年 09月 30日 (30. 09. 2003)
2-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08500
2-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則28 (3) の規定に基づき、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料分譲されることを可能とすることを出願人は希望する (Rule 28 (4) EPC)
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

原本(出願用)

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

3	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
3-1	記載頁	22
3-2	行	19
3-3	寄託の表示	
3-3-1	寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
3-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6
3-3-3	寄託の日付	2003年 10月 03日 (03.10.2003)
3-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08503
3-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料分譲されることを可能とすることを出願人は希望する (Rule 28(4) EPC)
3-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	✓
0-4-1	権限のある職員	果 司

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	28 OCT 2004
0-5-1	権限のある職員	薄池睦人

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015325

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K19/00, C17K16/00, C12N15/62, C12N5/10, C12P21/08,
A61K38/17, A61P35/00, A61P37/00, A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K19/00, C17K16/00, C12N15/62, C12N5/10, C12P21/08,
A61K38/17, A61P35/00, A61P37/00, A61P29/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),
GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/31140 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 April, 2002 (18.04.02), & AU 200194198 A & US 2003/0115614 A1 & EP 1331266 A1 & BR 200114475 A & KR 2003081312 A & MX 2003002974 A1	1-39
P, X	YAMANE-OHNUKI, N. et al., Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody- dependent cellular cytotoxicity., Biotechnol. Bioeng., 05 September, 2004 (05.09.04), Vol.87, No.5, pages 614 to 622	1-39

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 January, 2005 (13.01.05)

Date of mailing of the international search report

01 February, 2005 (01.02.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015325

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 03/85107 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 16 October, 2003 (16.10.03), & AU 2003236022 A1 & US 2004/0110704 A1	1-39
P, X	WO 03/85118 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 16 October, 2003 (16.10.03), & AU 2003236015 A1 & US 2004/0132140 A1	1-39

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 19/00, C07K 16/00, C12N 15/62, C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 38/17, A61P 35/00, A61P 37/00, A61P 29/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 19/00, C07K 16/00, C12N 15/62, C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 38/17, A61P 35/00, A61P 37/00, A61P 29/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JQIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/31140 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2002. 04. 18 & AU 200194198 A & US 2003/0115614 A1 & EP 1331266 A1 & BR 200114475 A & KR 2003081312 A & MX 2003002974 A1	1-39
P, X	YAMANE-OHNUKI, N. et al. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. Biotechnol. Bioeng. 2004. Sep. 5, Vol. 87, No. 5, p. 614-622	1-39

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 01. 2005

国際調査報告の発送日

01. 2. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 03/85107 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2003. 10. 16 & AU 2003236022 A1 & US 2004/0110704 A1	1-39
P, X	WO 03/85118 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2003. 10. 16 & AU 2003236015 A1 & US 2004/0132140 A1	1-39